

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

**Efeito do esqualeno em ratos Wistar submetidos ao
modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito
Resistente”**

Mestranda: Clarissa Scolastici

Orientador: Dr. Fernando Salvador Moreno

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Patologia para obtenção
do título de Mestre

Botucatu, São Paulo

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Scolastici, Clarissa.

Efeito da esqualeno em ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” / Clarissa Scolastici. – 2003.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2003

Orientador: Fernando Salvador Moreno

Assunto CAPES: 40101045

1. Câncer - Quimioprevenção - Estudos experimentais

CDD 616.994

Palavras-chave: Esqualeno; Isoprenóides; Quimioprevenção; Hepatocarcinogênese química; modelo do “Hepatócito Resistente”

*Ao professor **Fernando Salvador Moreno**, pela paciência, amizade, dedicação e principalmente pela preocupação com a minha formação científica.*

Agradecimentos

- A **Deus** pois sem Ele nada é possível.
- Ao Professor **Dr. Fernando Salvador Moreno** pela orientação e dedicação.
- A **Dra. Daisy Fávero Salvadori e Dr. João Lauro de Camargo** pelo apoio na realização deste trabalho.
- As professoras **Dra. Maeli Dal Pai Silva e Dra. Cláudia Pelizzon** pela amizade e colaboração.
- A professora **Dra. Sheila Zambello Pinho** pelas análises estatísticas.
- Ao **Paulo Roberto Cardozo e Maria Luíza Falagueira Ardanaz** pelo processamento do material.
- A **Silvania M. Peres Neves** pelo fornecimento e cuidado com os animais.
- A **Tania Andrade** pelo auxílio nos assuntos da pós-graduação e pela paciência.
- A **Elaine** pelo auxílio na Técnica do Cometa.
- A **Ana Lúcia e Luís Fernando Barbisan** pela incansável paciência e ajuda sempre que precisei.
- Ao colegas de pós-graduação **Rodrigo, Roueda, Erick, Álisson, Ana Paula, Marina, Márcia, Carla, Daniel, Tony, Patrícia, Lízia, Marcelo e Kátia** pelo convívio e amizade.
- Aos colegas do Laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer **Roseli, Elaine, Cida, Thomas, Renato, Rogério, Mariana e Carlos** pela convivência e amizade.
- Aos meus queridos amigos **Samantha, Sabrina, Juliana, Robson, Maristela, Thomaz, Flávio, Eva, Andréia, Jeane e Aniele** pelo apoio incondicional e grande amizade em todos os momentos.
- Aos **funcionários** da seção de pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu.
- A **CNPq** pelo auxílio financeiro.
- A **todos** que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

*Ao meu pai **José** e minha
mãe **Sônia**, pelo dom da vida
e sem os quais essa
conquista não seria possível.
A vocês minha eterna
gratidão.*

*Aos meus irmãos **Marcus**,
Érika e **Leandro**, a minha
cunhada **Juliana** e meu
adorável sobrinho **Mateus**,
pela presença, carinho e
incentivo.*

*A minha querida avó
Antônia, meus tios **Wilson**
e **Fernando**, pela
dedicação, paciência e
apoio em todos os
momentos.*

Resumo

No presente estudo foi avaliado o eventual efeito quimiopreventivo do esqualeno, um triterpeno intermediário na biossíntese de esteróides em plantas e animais e constituinte do óleo de oliva, quando administrado a ratos Wistar durante 8 semanas consecutivas em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente” (RH). Animais tratados apenas com óleo de milho ou água e submetidos ao modelo do RH foram utilizados como controles. A análise estatística de nódulos visíveis macroscopicamente e de lesões pré-neoplásicas GST-P positivas, não revelou efeito quimiopreventivo significativo por parte do esqualeno. Os índices de proliferação celular e de apoptose foram semelhantes entre os grupos. Da mesma forma, a análise de danos no DNA mostrou ausência de proteção por parte do esqualeno. Por outro lado, o aumento dos níveis plasmáticos de colesterol total sugere que o esqualeno foi absorvido. Assim, nossos dados não demonstram atividade quimiopreventiva digna de nota por parte do esqualeno, quando administrado durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH.

Palavras-chaves: hepatocarcinogênese química, modelo do “hepatócito resistente”, quimioprevenção, isoprenóides, esqualeno.

I – REVISÃO DE LITERATURA

1. Carcinogênese química e suas etapas

Carcinogênese é um termo geral utilizado para denotar o processo complexo de desenvolvimento do câncer. Esse processo é considerado um fenômeno ativo podendo ser induzido por vários agentes: químicos, físicos ou biológicos (Pitot & Dragan, 1991).

A carcinogênese química pode ser induzida por cancerígenos *diretos*, que parecem não requerer qualquer conversão prévia para induzir a carcinogênese, ou *indiretos*, que agem através de seu metabólito reativo originado após a sua metabolização (Venitt, 1994).

O desenvolvimento do câncer induzido quimicamente é considerado um processo em múltiplas etapas (Schulte-Hermann, 1985; Farber & Sarma, 1987; Pitot & Dragan, 1991; Pitot, 1993). Evidências indicam que a neoplasia pode se desenvolver em três etapas básicas denominadas iniciação, promoção e progressão (Pitot et al., 1996), sendo que duas dessas etapas estão bem caracterizadas operacionalmente: a iniciação e a promoção.

Na etapa de iniciação o agente químico genotóxico provoca alterações irreversíveis em genes relacionados aos processos de proliferação e diferenciação celular (Bos & Kreijl, 1992). A ocorrência eventual de proliferação celular reparativa ou compensatória, “fixa” essas lesões de DNA, impedindo o reparo eficiente e a eliminação (morte celular) dessas células, originando células-filhas iniciadas (Cayama et al., 1978; Cohen & Ellwein, 1990; Kaufmann et al., 1991). A morte celular por apoptose de células com DNA lesado, pode representar um importante

mecanismo protetor contra o desenvolvimento da neoplasia (Schulte-Hermann et al., 1995; Grasl-Kraupp et al., 2000).

A etapa de promoção envolve a seleção e proliferação clonal das células iniciadas, com formação de lesões pré-neoplásicas (Schulte-Hermann, 1985; Farber & Sarma, 1987; Pitot & Dragan, 1991; Pitot, 1993). Os promotores atuam provocando expansão clonal de células iniciadas, através do aumento da proliferação celular (Cohen & Ellwein, 1990; 1991) e inibição da morte celular programada (apoptose) (Schulte-Hermann et al., 1990; Wright et al., 1994).

O último estágio do desenvolvimento neoplásico, a progressão, caracteriza-se por instabilidade genômica e contínua evolução das características independentes, como mudanças bioquímicas das células malignas, aumento da proliferação celular, invasão, anaplasia e metástase (Pitot & Dragan, 1991). A irreversibilidade desse estágio é assumida pelas alterações no genoma da célula (Pitot & Dragan, 1991).

2. Lesões hepáticas pré-neoplásicas

O fígado tem se destacado como órgão de estudo das diferentes etapas da carcinogênese química experimental devido ao seu grande tamanho, sua relativa homogeneidade estrutural e, em particular, pela facilidade de indução e detecção de lesões pré-neoplásicas (Moore & Kitagawa, 1986; Farber & Sarma, 1987; Ito et al., 1988; 1989; 2000; Bannasch et al., 1989; Bannasch & Zerban, 1992). O câncer hepático induzido quimicamente em roedores também ocorre através do desenvolvimento de alterações seqüenciais. A iniciação é causada por carcinógenos genotóxicos que causam danos no DNA. Esses danos podem ser avaliados através da técnica do “cometa” que, em condições alcalinas, é um teste sensível para detectar danos ou reparo no DNA em células individualizadas (Hartman & Speit, 1994; Tice,

1995), além de identificar níveis de fragmentação do DNA decorrentes do processo de necrose e apoptose (Fairbain et al., 1996). A falha na correção desses danos seguida da proliferação celular leva à formação inicial de focos de hepatócitos alterados fenotipicamente (FHA). A atividade proliferativa celular pode ser detectada por vários métodos. Um dos mais utilizados é a detecção imuno-histoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), presente durante as várias fases do ciclo celular (Eldridge et al., 1993). Essa detecção pode ser realizada em vários tipos de tecidos, inclusive o fígado (Foley et al., 1991; Eldridge et al., 1993). Os FHA progredem para nódulos, adenomas e, por fim, para o câncer. A demonstração de que essas alterações estão seqüencialmente associadas, indica que os focos representam etapas pré-neoplásicas, podendo ser considerados marcadores histológicos da futura neoplasia hepática (Bannasch, 1986; 1990; Farber & Sarma, 1987; Enzmann & Bannasch, 1987; Farber, 1988).

Diferentes tipos de FHA, induzidos por carcinógenos químicos, têm sido identificados no fígado de ratos, na dependência das alterações de seus componentes citoplasmáticos, como glicogênio, retículo endoplasmático, ribossomos e peroxissomos (Bannasch et al., 1989; Bannasch & Zerban, 1992). Assim, sob coloração de rotina com hematoxilina e eosina (H&E), as alterações permitem classificar os focos de hepatócitos alterados de acordo com a sua morfologia. O conhecimento de que as células dos focos exibem atividade enzimática diferente das células normais, permite marcá-las imuno e histoquimicamente, através de marcadores enzimáticos, tais como, glutamiltranspeptidase (GGT), adenosiltrifosfatase (ATPase), glicose-6 fosfatase (G-6-Pase) e glutationa S-transferase, forma placentária (GST-P) (Butler et al., 1981; Hanigan & Pitot, 1985; Satoh et al., 1985; Pitot et al., 1989, Bannasch et al., 1982; 1989). Essa última, a forma

placentária da glutathione S-transferase (GST-P), foi estabelecida como um dos melhores marcadores dos focos pré-neoplásicos no fígado de rato (Sato et al., 1985; Ito et al., 1989; 2000; Dragan & Pitot, 1992).

3. Modelos de hepatocarcinogênese química

São grandes os progressos no estudo da hepatocarcinogênese desde o primeiro modelo de câncer de fígado descrito por Sasaki & Yoshida em 1935. Várias modificações foram realizadas com a finalidade de se obter um modelo que permitisse o estudos das várias etapas do processo carcinogênico. O sistema de dois estágios na formação do tumor hepático foi introduzido por Peraino et al. (1971).

Desde então, diversos modelos têm sido descritos para o estudo da hepatocarcinogênese química induzida em ratos, sendo parte deles baseado nos conceito de iniciação de promoção da carcinogênese química (Ito et al., 1988; 1989; 2000; Dragan, 1992).

Um dos modelos mais utilizados para o estudo de hepatocarcinogênese e o modelo do “hepatócito resistente” (RH) descrito em 1976 (Solt & Faber, 1976) e modificado em 1987 por Semple *et al.*, sendo modelo é adequado para induzir elevada incidência de cânceres, bem como para melhor se avaliar e comparar efeitos de substâncias capazes de modular o processo carcinogênico.

O modelo é baseado na hipótese de que o 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) é capaz de inibir a proliferação da maioria dos hepatócitos normais, mas não a dos resistentes que foram gerados durante a iniciação. Consiste na iniciação de ratos jovens machos pela dietilnitrosamina (DEN), por via intraperitoneal. Após período de duas semanas, os animais recebem via intragástrica, doses diárias de 2-AAF, um potente agente mito-inibitório para a proliferação dos hepatócitos normais. Após 24

horas da última dose, os animais são submetidos a hepatectomia parcial de 2/3, responsável pelo estímulo proliferativo, criando, desta forma, um ambiente seletivo em que os hepatócitos iniciados apresentam vantagem de crescimento, enquanto as células não-iniciadas têm seu crescimento inibido. Desta maneira, focos e nódulos de hepatócitos, considerados pré-neoplásicos, podem ser vistos 5 a 10 dias após a hepatectomia parcial.

A pressão de seleção para gerar focos e nódulos desse modelo é bastante intensa ocorrendo de forma sincronizada, o que possibilita assim, estudos mais detalhados do desenvolvimento neoplásico (Farber & Sarma, 1987).

Em diversos dos protocolos de hepatocarcinogênese a proliferação dos hepatócitos em focos ou nódulos pré-neoplásicos é bastante lenta, em geral assincrônica. Já no modelo do RH isto acontece, ao contrário, de forma rápida e sincronizada de modo que nódulos precoces já podem ser vistos macroscopicamente em uma ou duas semanas após a etapa de seleção/promoção inicial. A grande maioria sofre remodelação, um processo altamente complexo envolvendo mudanças no suprimento sanguíneo e em características bioquímicas, bem como da estrutura e arquiteturas celulares, retornando ao aspecto anterior do fígado. Uma pequena parte (2-5%) segue outro caminho, o da persistência (Tatematsu et al., 1983).

4. Quimioprevenção, dieta e câncer

Avaliações recentes indicam que menos que se adote medidas rigorosas de controle, o câncer se converterá na principal causa de morte em muitos países no início desse século. A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) estimou que em 2000 ocorreram no mundo mais de 19 milhões de casos novos e que 11 milhões de pessoas morreram em decorrência de algum tipo de câncer (OMS, 2001).

Neste mesmo ano, os doze cânceres com maiores mortalidades foram os de pulmão, estômago, fígado, cólon e reto, esôfago, mama, boca e faringe, cérvix, próstata, bexiga, ovário e endométrio (OMS 2001), sendo que todos eles estão relacionados com a alimentação, incluindo o de pulmão, também associado com o cigarro (OMS 2001).

Estudos epidemiológicos demonstram que as incidências regionais do câncer estão diretamente relacionadas aos hábitos de vida, condições sócio-econômicas e principalmente com a alimentação (Doll & Peto, 1981). Por esse motivo, a ligação entre hábitos alimentares e risco de câncer têm sido alvo de diversos estudos epidemiológicos, pré-clínicos e experimentais (Milner, 2002). Esses estudos demonstram que a identificação da ocorrência natural de carcinógenos e anticarcinógenos alimentares é útil não apenas para o entendimento da carcinogênese como também para novas estratégias de prevenção (Rao et al., 1998).

Estudos epidemiológicos ressaltam de forma geral, o papel da dieta na quimioprevenção de neoplasias no ser humano (Bertran et al., 1987; Potter & Steinmetz, 1996; Omenn, 1996; Reddy, 1996; Riboli & Norat, 2001).

A quimioprevenção do câncer pode ser definida como uma forma de prevenir a doença através da administração de um ou mais compostos químicos durante as etapas iniciais pré-neoplásicas da carcinogênese (Sporn et al., 1976; Albertsd & Garcia, 1995; Pezzuto; 1997, Tamini et al., 2002). Os quimioprotetores podem ser classificados em três categorias, de acordo com seus efeitos nas diferentes fases da carcinogênese: 1) inibidor da formação do carcinógeno; 2) bloqueador de metabólito ativo e, 3) supressor do desenvolvimento neoplásico (Wattenberg, 1985). Entretanto, é difícil a classificação precisa dos agentes quimiopreventivos, visto que os mecanismos

de ação da maioria dos compostos são desconhecidos, e muitos deles atuam no processo de carcinogênese através de diferentes mecanismos (Stoner et al., 1997).

Diversos dos inibidores da carcinogênese até agora identificados são constituintes naturais dos alimentos (Dragsted et al., 1993; Ames et al., 1995; Gescher et al., 1998). Assim, a investigação dos mecanismos através dos quais a alimentação influencia o câncer pode contribuir para a elucidação de aspectos fundamentais da carcinogênese e do comportamento biológico das neoplasias malignas, e ter impacto em estratégias de prevenção (Rogers et al., 1993; Ames et al., 1995; Milner, 2002).

Frutas, hortaliças e grãos de cereais apresentam papel relevante na proteção a determinados tipos de cânceres (Terry et al., 2001). Os mesmos se constituem importantes fontes de derivados do metabolismo do mevalonato (Elson & Yu, 1994), os chamados isoprenóides, que nos últimos anos têm chamado a atenção da comunidade científica em função de sua promissora ação relatada na quimioprevenção e quimioterapia do câncer (Elson & Yu, 1994; Moreno et al., 1995; Crowell, 1999; Elson et al., 1999).

5. Via do mevalonato e isoprenóides

Através do ciclo do mevalonato as plantas sintetizam produtos naturais derivados de uma unidade comum isoprênica de 5 carbonos, que diferem uns dos outros pela sua complexidade, tamanho e função (Bach, 1995). Por essa via formam-se os carotenóides encontrados nas plantas e colesterol nos animais (Stermer et al., 1994) (Figura 1). O início da biossíntese se dá através da formação de pirofosfato de isopentila a partir da acetil-CoA.

As reações iniciam-se com a formação de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMGCoA), que em seguida é reduzida a mevalonato (Stryer, 1988). A seguir, o

mevalonato é convertido em pirofosfato de isopentila através de três reações consecutivas com gasto de ATP. Assim, adições sucessivas de unidades isoprênicas formam geraniol (C₁₀) e farnesol (C₁₅). A partir desse ponto a via se divide em duas: a primeira envolve a extensão do farnesol resultando em fitol (C₂₀), dolicol (C₇₀₋₁₂₀) e borracha (C₂₈₀₀₋₂₀₀₀₀) e na formação dos carotenóides nas plantas, enquanto a segunda envolve a ligação de dois resíduos de farnesol, formando esqualeno (C₃₀) que é convertido em lanosterol e, após várias etapas, é formado o colesterol pela perda de 3 grupamentos metila nos animais (Stryer, 1988; Koolman & Rohm, 1996).

A síntese do mevalonato consiste em etapa crítica desse metabolismo, sendo catalisada pela enzima HMGCoA redutase (Stryer, 1988). A HMG-CoA redutase é uma enzima cuja atividade é uma das mais reguladas da natureza através de mecanismos transcricional e pós-transcricional. Nos animais é modulada por um controle multivalente, sendo reprimida por produtos esteróis como colesterol, e não esteróis, derivados do ciclo do mevalonato (Goldstein & Brown, 1990).

Lesões pré-neoplásicas e neoplásicas apresentam perda do mecanismo de retro-regulação inibitória da atividade da enzima HMGCoA redutase e maior sensibilidade à regulação inibitória dos isoprenóides. Essa inibição estaria limitada à disponibilidade de intermediários derivados da via do mevalonato, o que explicaria a acentuada atividade inibitória do crescimento de neoplasias, constatada após a administração de isoprenóides (Elson & Yu, 1994; Elson et al., 1999).

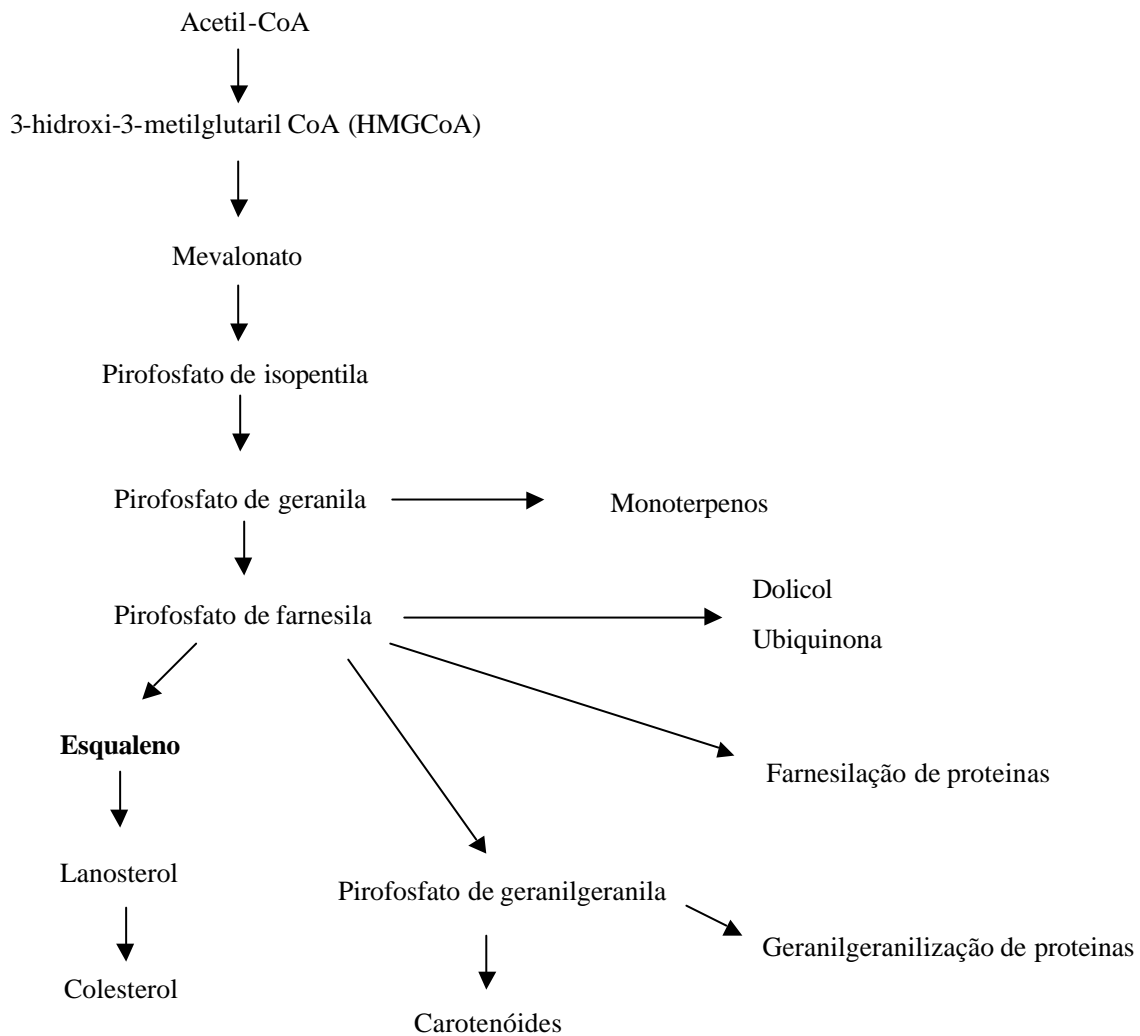


Figura 1: Via resumida do mevalonato em plantas e mamíferos; adaptado de CROWELL *et al.*, 1991; BACH, 1995; ELSON, 1995.

Nesse sentido, diversos isoprenóides foram testados quanto a seus respectivos potenciais de inibição da formação de neoplasias, como o papel dos tocotrienóis e farnesol em células da linhagem B16 de melanoma murínico (He *et al.*, 1997), do farnesol em células CEM-C1 de leucemia aguda humana (Voziyan *et al.*, 1995) ou em focos de criptas aberrantes induzidas por azoximetano (AOM) em F344 (Wargovich *et al.*, 2000) e do geranilgeraniol em adenocarcinoma de colón (Ohizumi *et al.*, 1995). A administração de limoneno em ratas durante a fase de iniciação ou promoção/progressão da carcinogênese mamária reduziu o aparecimento de

neoplasias em comparação aos controles (Elson et al., 1998) além de inibir a formação de adenomas pulmonares (Wattenberg et al., 1989). O álcool perillil, também derivado dessa via, demonstrou uma inibição de neoplasias no modelo de carcinogênese de cólon induzida pelo azoximetano (Reddy et al., 1997) e demonstrou efeito quimiopreventivo em modelos de pulmão em neoplasias induzidas por 4-(metilnitrosamina)-1-(piridil)-1-butanona (NNK) (Lantry et al., 2000). Trabalhos do nosso grupo também demonstram o efeito quimiopreventivos de diversos derivados do metabolismo de mevalonato. Em ratos submetidos ao modelo do “hepatócito resistente”, a administração de vitamina A e ácido retinóico 9-cis e todo-trans inibiu a proliferação celular quando administrado durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese (Silveira et al., 2001). A administração do β -caroteno em ratos submetidos a modelo de proliferação celular (hepatectomia parcial) inibe a expressão da enzima HMG-CoA redutase através de mecanismos pós-transcricionais, o que sugere que seu efeito quimiopreventivo ou inibitório do câncer pode se dever a alterações no metabolismo de isoprenóides (Moreno et al., 1991; 1995). O farnesol e geraniol na dose de 25 mg/kg de p.c. apresentou efeito protetor no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas de fígado, embora nesse caso, o farnesol tenha se apresentado mais efetivo (Ong et al., 2001). Em outro estudo, a β -ionona e geranilgeraniol administradas nas doses de 8 e 16 mg/kg p.c. reduziu o número e área de lesões pré-neoplásicas de fígado, bem a proliferação da celular. A β -ionona apresentou efeito quimiopreventivo nas duas doses administradas, com maior efeito na dose de 16 mg/kg p.c., sugerindo, inclusive a existência de uma relação dose/efeito (Espíndola, 2002). No caso do geranilgeraniol foi observada quimioprevenção apenas na dose de 8 mg/kg de p.c. (Espíndola, 2002).

6. Esqualeno e óleo de oliva

O óleo de oliva é um importante alimento, consumido há milhares de anos na região do Mediterrâneo (Newmark, 2000) onde é associado à baixa incidência de doenças coronarianas e a alta expectativa de vida (Smith et al., 2000; Stark & Madar, 2002).

Estudos epidemiológicos sugerem que o aumento do consumo do óleo de oliva tem papel benéfico na prevenção de alguns tipos de cânceres (Smith et al., 1998; Rao et al., 1998). Em populações mediterrâneas o consumo do óleo de oliva está associado a um menor risco de desenvolvimento do câncer de mama ou pancreático (Newmark, 2000). A mortalidade de câncer de pulmão é menor no sul da Itália, onde há maior consumo do óleo, do que ao norte do país (Smith et al., 1998).

Segundo Newmark, em recente revisão, o esqualeno seria um dos principais responsáveis pelos efeitos protetores do óleo de oliva (Newmark, 2000).

O esqualeno consiste em um triterpeno intermediário na biossíntese de esteróides em plantas e animais (Figura 2). É um hidrocarboneto polinsaturado formado por seis unidades isoprênicas (30_c), que se origina do fechamento de triterpenos acíclicos da via do mevalonato (Figura 1) (Rao et al., 1998; Newmark 2000; Sporn & Shu, 2000).

Amplamente distribuído na natureza, o esqualeno recebe esse nome devido a sua ocorrência em grandes quantidades no óleo de fígado de tubarão do gênero *Squalus sp* (Nakamura, 1997). É encontrado também em menores proporções (0,1 a 0,7%) em óleo de plantas, particularmente no óleo de oliva, e em lipídeos da pele humana (Tilvis & Meittinen, 1982).

Estudos experimentais demonstram que aproximadamente 60% do esqualeno administrado na dieta são absorvidos pelas células intestinais (Strandberg et al., 1990).

Após a absorção, o esqualeno é rapidamente transportado até o fígado onde é metabolizado, via colesterol, em sais biliares forma em que é excretado pelas fezes (Tilvis & Miettinen, 1982). Os níveis séricos de colesterol aumentam 6 horas após a administração de esqualeno e retornam aos níveis normais após 8 horas. Já os níveis séricos de esqualeno aumentam 8 horas após a sua administração e retornam aos níveis normais após 24 horas. A concentração hepática de esqualeno atinge pico máximo após 4 horas, voltando aos níveis iniciais após 24 horas da administração (Nakamura et al., 1997).

Recentes estudos têm demonstrado a atividade anti-neoplásica do esqualeno, mostrando que esse reduz significativamente o desenvolvimento e crescimento de neoplasias em roedores (Smith et al., 1998; Newmark, 2000).

Estudos *in vitro* demonstraram que o esqualeno é um potente inibidor da hiperproliferação aberrante de células mamárias de origem epitelial, prevenindo assim a sua transformação neoplásica (Newmark, 2000).

Estudos em modelos de carcinogênese de pele mostraram que esqualeno o é um potente inibidor de neoplasias induzidos pelo benzo[a]pireno em camundongos (Van Durren & Goldschmidt, 1976). Em ratos, este suprimiu o efeito promotor do éster de forbol (TPA) em neoplasias iniciadas pelo 7,12-dimetilbenz[a]antraceno quando administrado via tópica (Murakoshi, 1992) e induziu a regressão desses neoplasias quando administrado em associação com vitamina A e D (Desai, 1996). Em modelos de carcinogênese de cólon, a administração do esqualeno na dieta (1%) inibiu significativamente a formação de focos de criptas aberrantes (FCA) de cólon em ratos F344 induzidas pela azoximetano (Rao et al., 1998). Da mesma forma, dieta com óleo de oliva preveniu o desenvolvimento de FCA e carcinomas de cólon em ratos,

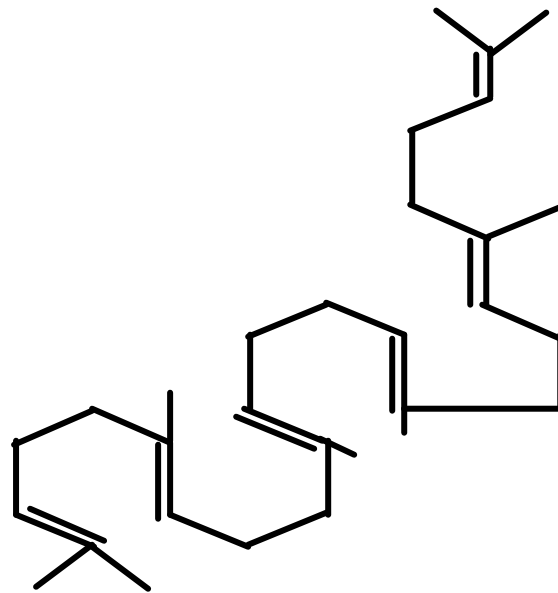


Figura 2. Estrutura do esqualeno.

mostrando seu efeito quimiopreventivo na carcinogênese de cólon (Bartoli et al., 2000). Smith observou o efeito protetor do esqualeno administrado na ração (2%), em neoplasias de pulmão induzidos quimicamente pela 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), substância encontrada no tabaco.

Assim, o estudo da ação quimiopreventiva do esqualeno na hepatocarcinogênese poderá representar uma válida contribuição nesta área, visto que até o momento são ainda escassas as informações disponíveis na literatura a respeito do papel desta substância no processo de carcinogênese.

II – OBJETIVOS

Avaliar o possível efeito quimiopreventivo do esqualeno, quando administrado durante 8 semanas consecutivas durante as etapas de iniciação e seleção/promoção da hepatocarcinogênese química, no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas em ratos Wistar submetidos ao modelo do “hepatócito resistente”.

1. Introdução

Estudos epidemiológicos em populações do Mediterrâneo sugerem que o elevado consumo de óleo de oliva está associado à diminuição do risco de desenvolvimento de alguns tipos de cânceres (Newmark, 2000). Da mesma forma, em animais de experimentação a administração de óleo de oliva apresentou efeito quimiopreventivo em uma variedade de neoplasias induzidas quimicamente (Reddy et al., 1996; Rao et al., 1998; Newmark 2000). Segundo Newmark (2000), o esqualeno, presente em concentrações em torno de 0,7% no óleo de oliva, é apontado como o principal responsável pelos efeitos benéficos do mesmo. Este consiste em um triterpeno intermediário na biossíntese de esteróides em plantas e animais. É um hidrocarboneto poliinsaturado constituído por seis unidades isoprênicas, que se origina do fechamento de terpenóides acíclicos da via do mevalonato (Rao et al., 1998; Newmark, 2000; Sporn e Shu, 2000). Sua atividade anti-neoplásica, bem como a de outros derivados dessa via, tem sido demonstrada recentemente a partir da redução significativa do desenvolvimento de neoplasias em roedores (Elson & Yu, 1994; Crowell, 1999). O mecanismo proposto para inibição do desenvolvimento neoplásico pelo esqualeno baseia-se no conhecimento do seu papel inibitório na atividade da enzima HMG-CoA redutase, diminuindo, assim, a síntese de intermediários da via do mevalonato, como o pirofosfato de farnesila e de geranylgeranila (Newmark, 2000). Esses derivados do mevalonato são fundamentais para os processos de farnesilação e geranylgeranilação protéica de certos proto-oncogenes (Brown & Goldstein, 1974; Newmark, 2000). Além

disso, metabólitos não esteróides derivados dessa via influenciam a fase de síntese de DNA do ciclo celular (Quesney-Huneus et al., 1983; Elson et al., 1999) e, portanto, a própria proliferação celular.

Assim, estudos em modelos de carcinogênese de pele demonstraram que o esqualeno é um potente inibidor de neoplasias induzidas pelo benzo[*a*]pireno em camundongos (Van Durren & Goldschmidt, 1976). Da mesma forma, este suprimiu em ratos o efeito promotor do éster de forbol em neoplasias iniciadas pelo 7,12-dimetilbenz[*a*]antraceno quando administrado por via tópica (Murakoshi et al., 1992) e induziu a regressão dessas neoplasias, quando administrado em associação com as vitaminas A e D (Desai et al., 1996). Em modelos de carcinogênese de cólon, a administração de esqualeno a 1% na ração inibiu significativamente a formação de focos de criptas aberrantes (FCA) de cólon em ratos F344, induzidos pelo azoximetano (Rao et al., 1998). Além disso, descreve-se que ração preparada com óleo de oliva preveniu o desenvolvimento de FCA e carcinomas de cólon em ratos, demonstrando seu efeito quimiopreventivo na carcinogênese de cólon (Bartoli et al., 2000). Já Smith (1998) observou o efeito protetor do esqualeno administrado na ração a 2%, em neoplasias de pulmão induzidas quimicamente pela 4-(metilnitrosamina) -1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), substância encontrada no tabaco.

São inúmeros os progressos observados no estudo da hepatocarcinogênese desde a descrição do primeiro modelo de câncer de fígado por Sasaki & Yoshida, em 1935. Desde então, várias modificações foram realizadas com a finalidade de se obter um modelo que possibilitasse o estudo das várias etapas do processo carcinogênico. O modelo do “hepatócito resistente” (RH), descrito em 1976 (Solt & Faber, 1976) e modificado em 1987 por SEMPLE et al. é um dos protocolos experimentais mais utilizados

no estudo da hepatocarcinogênese química, sendo adequado para induzir elevada incidência de neoplasias, bem como para se avaliar e comparar os efeitos de substâncias quimioprotetoras capazes de modular o processo carcinogênico (Farber & Farma 1987; Oliveira et al., 2001). O modelo baseia-se na hipótese de que o 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) é capaz de inibir a proliferação da maioria dos hepatócitos normais, mas não a dos resistentes que foram gerados durante a iniciação. Nesse modelo, diferentes estágios do processo de hepatocarcinogênese podem ser identificados, uma vez que um grande número de focos e nódulos de hepáticos é rapidamente induzido de forma sincronizada, facilitando, desta forma, estudos mais detalhados. As lesões pré-neoplásicas podem ser facilmente identificadas e quantificadas quanto a sua área e número por meio de morfometria. Assim, é possível se avaliar no modelo do RH não apenas a iniciação, mas também a seleção e expansão clonal de células iniciadas (Farber, 1980; Ezzmann et al., 1998).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do esqualeno, quando administrado durante 8 semanas consecutivas durante as etapas de iniciação e seleção/promoção da hepatocarcinogênese química, no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH.

2. Material e Métodos

2.1. Animais e Tratamento

Ratos Wistar machos com 4 semanas de idade foram obtidos do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP, São Paulo, Brasil), pesando entre 60-80 g no início de experimento. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (quatro ratos/caixa), forradas com maravalha autoclavada, cobertas com grades de metal, em sala mantida a 22 ± 2 °C, 55 ± 10 % de umidade e ciclos de 12 horas de claro e escuro. Estes foram tratados com ração comercial Purina (LABINA-PURINA, Campinas, SP) e água *ad libitum* durante todo o experimento.

Ao final do período de aclimação os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (**Figura 1**). Os dos grupos *Esqualeno 100* e *Esqualeno 150* foram tratados com esqualeno (100 e 150 mg/100 g de peso corpóreo [p.c.], respectivamente) dissolvido em óleo de milho (Mazola®), via intragástrica, todos os dias por 8 semanas consecutivas. Os animais do grupo *Óleo* receberam óleo de milho (0,25 mL/100 g de p.c.), via intragástrica, servindo de controle para os dois primeiros, e os do grupo *Água* receberam apenas água, via intra-gástrica (0,25 mL/100 g de p.c.), servindo de controle para o grupo *Óleo*. Todos os ratos foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH. Para tanto, receberam na segunda semana do experimento uma dose de dietilnitrosamina (DEN, Sigma Chemical Co., MO, USA; 20 mg/100 g de p. c.), via intraperitoneal, para iniciação da hepatocarcinogênese. Após duas semanas, foi realizada hepatectomia parcial de 2/3 (Higgins & Anderson, 1931). Os animais receberam, via intragástrica, seis doses de 2-acetilaminofluoreno ((2-AAF, Sigma Chemical Co; MO, USA; 2 mg/100 g de p. c.), sendo as quatro primeiras em quatro dias consecutivos antes da hepatectomia parcial e as duas restantes após a mesma, em dias alternados. Seis semanas após a iniciação com DEN, os animais foram anestesiados e sacrificados por

exsanguinação, colhendo-se, na ocasião, sangue por punção da aorta abdominal. O procedimento de manuseio, administração de substâncias, anestesia e sacrifício dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA), protocolo nº 266.

2.2. Colheita de Amostras de Fígado, Processamento e Histologia

Imediatamente após o sacrifício, o fígado de cada animal foi retirado, lavado em solução de NaCl a 0,9%, pesado e avaliado quanto à presença de formações nodulares visíveis macroscopicamente. Após a análise, parte dos fragmentos de cada lóbulo foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e mantida a -80°C , para posterior análise de danos no DNA pelo teste do “cometa” (Tice et al., 1990;1991). Fragmentos dos lobos hepáticos foram fixados em formol tamponado a 10% por aproximadamente 48 horas, sendo então parafinizados para posterior obtenção de cortes histológicos de 5 μm que se destinaram à realização de reação imuno-histoquímica pelo método do complexo avidina-biotina (ABC) (Hsu et al., 1981) e coloração de rotina com hematoxilina-eosina (H&E).

2.3. Imuno-histoquímica para GST-P e PCNA

Cortes histológicos das amostras hepáticas foram processados para a realização de reação imuno-histoquímica para detecção de lesões pré-neoplásicas positivas para a enzima glutationa S-transferase forma placentária (GST-P) e hepatócitos positivos para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), de acordo com o método

descrito por Hsu et al. (1981). Basicamente, após desparafinização, a peroxidase endógena foi bloqueada por peróxido de hidrogênio a 3% (Merck, Alemanha) em solução salina tamponada (PBS), durante 5 min. Em seguida, estes foram incubados com anticorpo primário de coelho anti-GST-P (Medical & Biological Laboratories Co., Tóquio, Japão) na diluição de 1:1000, ou anticorpo primário de rato anti-PCNA (Dako A/S, Dinamarca) diluído a 1:200 em de albumina sérica bovina a 1%, durante a noite e a 4°C. Finalmente, os cortes foram incubados por uma hora com anticorpo secundário biotilado (Dako StrepABComplex/HRP Duet, Mouse/Rabbit, Dinamarca), aplicando-se, então, o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase biotilado (Dako StrepABComplex/HRP Duet, Mouse/Rabbit, Dinamarca). Os sítios de ligação da peroxidase foram detectados por incubação com 3,3'-diaminobenzidina (0,5%; Sigma) e peróxido de hidrogênio (0,1%) dissolvidos em PBS por cerca de 2 minutos, à temperatura ambiente. A contra-coloração dos cortes foi realizada com hematoxilina ou com H&E, para avaliação da expressão da enzima GST-P e PCNA, respectivamente.

Focos GST-P positivos foram mensurados utilizando-se fotomicroscópio Nikon (Microphot-FXA) conectado a um microcomputador, por meio de programa KS-300 (Kontron Elektronik, Germany). Os dados foram expressos em número (Nº de focos/cm²) e área de focos GST-P positivos por cortes de fígado (mm²/cm²). A proliferação celular foi determinada pelo índice de marcação (IM/%) do PCNA (hepatócitos PCNA positivos/número total de hepatócitos analisados x 100), por avaliação em microscópio de luz (Carl Zeiss, Alemanha) (objetiva de 40x) de 4000 hepatócitos / rato, sendo 2000 deles na área ao redor das lesões ("surrounding") e 2000 no interior de lesões pré-neoplásicas.

2.4. Avaliação da Apoptose

A apoptose foi avaliada sob coloração de rotina com H&E através da identificação de hepatócitos e corpúsculos em apoptose, basicamente de acordo com os critérios estabelecidos por Goldsworth et al., em 1996. Foram considerados como hepatócitos em apoptose, células compactas com cromatina condensada na periferia nuclear e com intensa acidofilia citoplasmática. Já corpúsculos em apoptose foram caracterizados por corpos acidófilos, com fragmentação ou ausência do núcleo, acompanhada de condensação e/ou fragmentação citoplasmática. O índice apoptótico (IA/%) (hepatócitos e corpúsculos em apoptose /número total de hepatócitos analisados x 100) foi determinado por avaliação em microscópio de luz (Carl Zeiss, Alemanha) (objetiva de 40x) de 4000 hepatócitos / rato, sendo 2000 deles na área ao redor das lesões (“surrounding”) e 2000 no interior de lesões pré-neoplásicas.

2.5. Técnica do “cometa”

Imediatamente após descongelamento do material, um fragmento da porção mediana do lóbulo direito foi isolado, lavado e homogeneizado delicadamente em solução de Hanks pH 7,4 e DMSO a 10%. A 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% (Sigma, EUA) foram adicionados 5 µl dessa suspensão de células e, em seguida, essa mistura foi aplicada sobre lâminas revestidas por uma camada de agarose de alto ponto de fusão a 1,5% (Sigma, EUA). As lâminas foram colocadas em solução de lise (1% Triton X-100, 2,5 mM NaCl, 0,1 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris e 10% DMSO, pH 10,0), a 4 ° C e durante 24 horas. Após o processo de lise, essas foram mantidas em tampão alcalino por 20 min (0,3 M NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH >13) e, em

seguida, submetidas a eletroforese (25 V/300 mA/7 W), por 20 minutos, a 4 °C. Posteriormente, o DNA foi corado com 50 µl de brometo de etídio (20 µg/ml) e as lâminas avaliadas em objetiva de 40x em microscópio de fluorescência (Olympus-Bx60, filtro: 515-560 nm; "barrier filter": 590 nm) acoplado a uma câmera de vídeo colorida CCD conectada a sistema de análise de imagens (*Comet II*, Perspective Instruments, UK). Foram analisados 50 nucleóides por animal, sendo considerados apenas aqueles com diâmetro maior do que 34 µm. Utilizando-se o programa *Comet II* (Perspective Instruments, Inglaterra) foram analisados os parâmetros de migração da cauda do cometa (µm; *Migração da Cauda*), a intensidade de fluorescência da cauda do cometa (*Intensidade da Cauda*) e a relação entre a migração e intensidade da cauda (*Momento da Cauda*) (Olive et al., 1990).

2.6. Quantificação da Concentração Plasmática de Colesterol Total

Imediatamente após a colheita, o sangue foi adicionado a tubos de centrífuga contendo 500 µl de EDTA (10µg/µl), e centrifugado a 3500 g, a 4°C, por 10 min. Após A centrifugação, foi colhido o plasma para quantificação do colesterol total por meio de técnica enzimática-espectrofotométrica ("kit" Cholesterol, BioSystems, S.A., Espanha). A análise foi realizada a 500 nm em espectrofotômetro modelo U 1100 (Hitachi, Japão).

2.7. Análise estatística

Para a realização da análise estatística foram utilizados os testes de One-way ANOVA, de Fisher e *t* de Student, quando os resultados apresentavam distribuição

normal e, quando isto não ocorreu, utilizou-se os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Em todos os casos, adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$ (Zar, 1994).

3. Resultados

Os valores dos pesos corpóreos e dos fígados dos ratos tratados durante 8 semanas consecutivas com esqualeno (100 ou 150 mg/100 g de p.c.), água ou óleo de milho (0,25 mL / 100 g de p.c.) e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente” (RH) encontram-se apresentados na **Tabela 1**. É possível se observar na mesma que os valores dos pesos corpóreos e dos fígados foram bastante semelhantes entre os diferentes grupos experimentais, indicando que o esqualeno não apresentou toxicidade digna de nota nas dosagens utilizadas.

A **Tabela 2** apresenta os resultados relativos à incidência, multiplicidade e número total de nódulos, referentes ao exame macroscópico dos fígados realizado por ocasião do sacrifício dos animais. A incidência de nódulos foi semelhante em todos os grupos experimentais. Além disso, a análise estatística do número e multiplicidade de nódulos não revelou diferença significativa entre os diversos grupos, independente do tratamento a que estes foram submetidos. Todavia, verifica-se que em comparação ao grupo Óleo (grupo controle), os ratos tratados com esqualeno na dose de 100mg / 100 g de p.c. tenderam a apresentar menor número total de nódulos de hepatócitos, bem como menor multiplicidade de LPN.

Os resultados da avaliação quantitativa do número (N° de focos/cm²) e da área agregada das lesões pré-neoplásicas GST-P positivas (mm²/cm²) estão apresentados na **Tabela 3**. De forma semelhante ao observado em relação aos resultados da análise macroscópica, não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação ao

número e área de LPN positivas para a GST-P dos animais dos diferentes grupos experimentais. Entretanto, a área agregada de focos GST-P positivos tendeu a ser menor no grupo *Esqualeno 100* em relação a seu respectivo grupo controle (grupo *Óleo*).

Na **Tabela 4** são observados os valores dos índices de marcação (IM%) de PCNA e apoptótico (IA%) das áreas ao redor das lesões (“surrounding”) e áreas de LPN ao final das oito semanas de experimento. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos experimentais, em relação a esses dois parâmetros. Todavia, animais tratados com esqualeno nas doses de 100 e 150 mg/100 g de p.c. tenderam a apresentar menor índice de marcação de PCNA nas áreas de LPN do que ratos do grupo controle (grupo *Óleo*). Da mesma forma, nesses dois grupos experimentais tratados com o isoprenóide o índice apoptótico tendeu a ser maior do que no grupo *Óleo* (controles), nas áreas de LPN. Animais tratados tão somente com óleo de milho e submetidos ao modelo do RH (grupo *Óleo*) tenderam a apresentar, por sua vez, em relação aos ratos do grupo *Água*, um maior índice de marcação de PCNA e menor índice apoptótico nas áreas de LPN (**Tabela 4**)

Além disso, os índices de marcação de PCNA dos grupos *Esqualeno 100* e *Óleo* foram maiores ($p < 0,05$) nas áreas de lesões pré-neoplásicas, do que em relação às suas respectivas áreas ao redor das lesões (“surrounding”). Em relação ao índice apoptótico, os grupos *Esqualeno 100*, e *Água* apresentaram índice apoptótico (IA%) nas áreas de LPN maior ($p < 0,05$) do que em suas respectivas áreas ao redor das lesões (“surrounding”). No grupo *Esqualeno 150* foi observada ainda tendência deste apresentar um maior índice apoptótico nas áreas de LPN, quando este foi comparado às respectivas áreas ao redor das lesões (**Tabela 4**).

Já a **Tabela 5** apresenta os valores referentes à *Migração da Cauda*, *Momento da Cauda* e *Intensidade da Cauda* dos cometas dos fígados dos ratos Wistar tratados durante 8 semanas consecutivas com esqualeno, óleo de milho ou água e submetidos ao modelo do RH. Assim, é possível se constatar na mesma que os animais tratados com esqualeno nas duas doses apresentaram os mesmos níveis de danos quando comparados ao grupo controle (grupo *Óleo*).

Finalmente, a **Figura 2** apresenta os valores de concentrações plasmáticas de colesterol ao término das oito semanas de experimento, de todos os grupos experimentais. Os grupos *Esqualeno 100* e *150* apresentaram maiores ($p < 0,05$) concentrações plasmáticas de colesterol total após tratamento com esqualeno, quando comparados ao grupo controle (grupo *Óleo*). Entre os grupos *Óleo* e *Água* não houve diferença estatisticamente significativa em relação à concentração plasmática de colesterol.

4. Discussão

Algumas poucas investigações epidemiológicas e experimentais sugerem a existência de um efeito quimiopreventivo do esqualeno em relação a determinados tipos de cânceres (Smith et al., 1998; Rao et al., 1998). No presente estudo foi avaliada a atividade quimiopreventiva do esqualeno em ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.

Assim, apesar das análises macroscópica e microscópica quantitativa de LPN positivas para GST-P apontarem para a eventual existência de um efeito quimiopreventivo por parte do esqualeno quando administrado na dose de 100 mg/100 g de p.c. no presente estudo, isto não foi aqui comprovado do ponto de vista estatístico,

inclusive em animais tratados com 150 mg/100 g de p.c. deste mesmo isoprenóide, o que indica a ausência de uma atividade quimiopreventiva mais pronunciada quando este foi administrado nessas doses a ratos Wistar submetidos ao modelo do RH.

As dosagens de esqualeno de 100 e 150 mg/100 g de p.c. administradas diariamente, via intragástrica, nos animais do presente estudo correspondem às utilizadas na maioria dos trabalhos de carcinogênese química, onde o mesmo foi fornecido incorporado na ração na concentração de 1 a 2%. Nesses trabalhos, a administração de esqualeno na ração a 1 % e 2% reduziu, respectivamente, o número de neoplasias de cólon induzidas pelo azoximetano (Rao et al., 1998; Bartoli et al., 2000) e o de neoplasias de pulmão induzidas pela 4-(metilnitrosamina) -1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) (Smith et al., 1998).

Descreve-se que além do esqualeno, outros isoprenóides da dieta, tais como o farnesol, lanosterol, geraniol e o geranilgeraniol, também apresentam ação inibitória da formação de intermediários do mevalonato com ação na redução da disponibilidade de pirofosfato de farnesila (FPP), resultando, portanto, na inibição do desenvolvimento de neoplasias (Newmark, 2000). Da mesma forma, estudos preliminares *in vitro* têm comparado a ação do esqualeno e suas doses com outros intermediários da via do mevalonato. Assim, trabalhos com cultura de células epiteliais de mamíferos mutadas para o gene *v-Ha-ras* transformado demonstraram que o geraniol, o farnesol e o lanosterol são de 8 a 12 vezes mais efetivos na inibição da proliferação celular do que o esqualeno em doses equivalentes (Katdare et al., 1997). A administração de lanosterol a 2% na ração a camundongos C57 com mutações no gene *V-Ha-ras* resultou, ainda, em diminuição de 47% no peso da neoplasia, o que corresponde ao mesmo resultado observado em animais tratados com ração com esqualeno a 4%. Resultados

semelhantes foram observados em trabalhos do nosso grupo. Nesse caso, foram avaliadas as eventuais atividades quimiopreventivas de outros derivados da via do mevalonato, em doses menores do que a do esqualeno utilizada no presente estudo, no mesmo modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”. Assim, a administração de farnesol e geraniol na dose de 25 mg/100 g de p.c. apresentou efeito protetor no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas de fígado, embora neste caso, o farnesol tenha se apresentado como mais efetivo (Ong et al., 2001). Em outro estudo, a β -ionona e o geranilgeraniol administrados nas doses de 8 ou 16 mg/100 de p.c. reduziram o número e área de lesões pré-neoplásicas de fígado, bem como a proliferação celular. A β -ionona apresentou efeito quimiopreventivo nas duas doses administradas, com maior efeito com a de 16 mg/100 g de p.c., sugerindo, inclusive, a existência de uma relação dose/efeito (Espíndola, 2002). No caso do geranilgeraniol foi observada quimioprevenção apenas com a dose de 8 mg/100 g de p.c. (Espíndola, 2002).

Esses resultados indicam que metabólitos do esqualeno ou seus precursores e outros derivados da via do mevalonato são mais efetivos e apresentam maior efeito quimiopreventivo do que o exibido pelo esqualeno, inclusive em doses menores, o que está de acordo com o sugerido por Newmark (2000).

Eventuais mecanismos de proteção do esqualeno foram investigados no presente estudo, através da avaliação da proliferação celular e da apoptose, por meio da determinação dos índices de marcação de PCNA e apoptótico, respectivamente. Assim, de acordo com os valores constatados desses índices não foi observada inibição estatisticamente significativa da proliferação celular ou indução da apoptose

após tratamento por oito semanas consecutivas com esqualeno, em suas duas dosagens. Entretanto, a administração desse isoprenóide nas doses de 100 e 150 mg/100 g de p.c. tendeu a inibir a proliferação celular e a induzir a apoptose nas áreas de LPN em ratos submetidos ao modelo do RH.

Desta maneira, isto está de acordo, de certa forma, com os resultados observados à macroscopia e à microscopia de LPN positivas para a enzima GST-P, que também não indicam claramente nessas condições experimentais a existência de uma atividade quimiopreventiva mais pronunciada por parte do esqualeno.

São poucos os dados da literatura que demonstram o papel do esqualeno na inibição da proliferação celular e indução da apoptose. Assim, quando se comparou o efeito do esqualeno com outros derivados da via do mevalonato como o geraniol, o farnesol e o lanosterol, constatou-se que estes foram de 8 a 12 vezes mais efetivos em inibir a proliferação celular do que o esqualeno, em doses equivalentes (Katdare et al., 1997). Em relação a apoptose, estudo com células de adenocarcinoma de pulmão mostrou que o farnesol e o geranilgeraniol induziram a apoptose desse tipo celular, enquanto o esqualeno não influenciou nesse mecanismo (Miquel et al., 1996).

Dados da literatura mostram que a proliferação celular é maior em lesões pré-neoplásicas do que em tecidos considerados normais ao redor das lesões (Kong & Ringer et al., 1996). No presente estudo isso foi confirmado quando se comparou o índice de marcação de PCNA de áreas de LPN ao índice da área ao redor das mesmas, em animais tratados com esqualeno (100 mg/100 g p.c.) ou óleo de milho (grupo Óleo, controles). Além disso, segundo a literatura, a apoptose também aumenta do tecido normal para focos de hepatócitos alterados, adenomas e carcinomas hepatocelulares (Kong & Ringer et al., 1996; Grash-Kraupp et al., 1997). Esse padrão de

evolução da apoptose foi aqui observado em animais tratados com esqualeno (100 mg/100 g p.c.), ou água, quando se comparou o índice apoptótico de áreas de lesões pré-neoplásicas ao índice de seu respectivo tecido normal adjacente.

Os níveis de danos no DNA foram avaliados, no presente estudo, por meio do teste do “cometa” (Singh et al., 1988). Embora essa técnica tenha como um dos principais objetivos a detecção da genotoxicidade de agentes químicos, esta possibilita também que se identifique a fragmentação do DNA decorrente de morte celular por necrose e/ou apoptose (Fairbain et al., 1996). Os resultados indicaram inexistência de proteção por parte do esqualeno em relação a danos no DNA de hepatócitos, em fígado de ratos tratados com esqualeno, óleo de milho ou simplesmente água, e submetidos ao modelo do RH. Por outro lado, esses resultados também demonstraram que o esqualeno não induziu danos no DNA em quaisquer das doses utilizadas.

As concentrações plasmáticas de colesterol total, que se apresentaram aumentadas nos grupos *Esqualeno 100* e *150* em relação ao grupo *Óleo* (controle) após administração do isoprenóide indicam que este foi absorvido quando administrado nas dosagens de 100 ou 150 mg/100 g de p.c./dia aos animais. Estudos em relação ao metabolismo do esqualeno demonstram o aumento das concentrações plasmáticas de colesterol até 6 horas após a administração do mesmo (Nakamura et al., 1997), tempo este maior do que o intervalo entre a última administração do esqualeno e o sacrifício dos animais às 8 semanas de experimento.

Assim, de uma forma geral, observou-se no presente estudo, e ao contrário do esperado segundo os dados da literatura, que houve apenas uma tendência do esqualeno em apresentar uma atividade quimiopreventiva, inibir a proliferação celular e induzir a apoptose quando administrado na dosagem de 100 mg/100 g de p.c./dia.

Uma ação protetora mais pronunciada poderia ser talvez observada quando da administração de outras doses do esqualeno, nessas mesmas condições experimentais.

Ainda segundo a literatura, descreve-se que o mecanismo de ação do esqualeno quando administrado na ração em relação à quimioprevenção de neoplasias seria atribuível a uma inibição da atividade da enzima HMG-CoA redutase (Strandberg et al., 1989). Essa inibição levaria a uma menor síntese de intermediários da via do mevalonato, como o FPP e o pirofosfato de geranylgeranila. Esses são essenciais aos processos de farnesilação e geranylgeranilação (prenilação) de determinadas proteínas. A prenilação protéica é um mecanismo que ocorre após a tradução, que envolve a adição de grupos hidrofóbicos à carboxila terminal de proteínas relacionadas a sinais celulares específicos, facilitando a associação destas à membrana celular e, conseqüentemente, a sua ativação. O produto de vários proto-oncogenes resulta em proteínas transdutoras de sinais celulares específicos que, por serem produzidas em ambiente aquoso no citosol, são hidrossolúveis. Um exemplo dessas proteínas é a p21, produto do proto-oncogene *ras*. Assim, a inibição da prenilação impede a ativação de proteínas transdutoras de sinais, inibindo, desta forma, a transformação neoplásica celular (Newmark, 2000; Elson et al., 1999). Deste modo, a retroalimentação inibitória causada pela administração de esqualeno na atividade da enzima HMG-CoA redutase resultaria em uma menor prenilação protéica, menor ativação de proto-oncogenes e, conseqüentemente, em uma inibição de lesões pré-neoplásicas (Newmark, 2000; Elson et al., 1999). Além disso, é observada ação direta entre síntese de derivados do metabolismo do mevalonato com a homeostase do colesterol, proliferação celular e com a transformação maligna (Brown & Goldstein, 1974; Elson et al., 1999). O

colesterol é requerido para proliferação celular durante a fase G1 do ciclo, enquanto outros derivados não esteróides apresentam papel fundamental durante a fase de síntese de DNA do ciclo celular (Brown & Goldstein, 1974; Elson et al., 1999).

Em estudo utilizando ratos com mutação no gene *Apc*, responsável pelo desenvolvimento de múltiplas neoplasias intestinais, tratados com esqualeno a 1% na ração não se observou redução de neoplasias intestinais ou mesmo aumento da sobrevivência dos animais (Newmark, 2000). Efeito similar foi constatado em ratos mutados para o gene *Apc 1638*, responsável pelo desenvolvimento de neoplasias espontâneas intestinais (Smits et al., 1997). É importante salientar que em tais modelos não são detectadas mutações no proto-oncogene *ras*, sugerindo que o esqualeno tem mais efeito em neoplasias que apresentam mutações nesse gene, através da prevenção do processo de prenilação (Newmark, 2000). Na hepatocarcinogênese, a ativação de proto-oncogenes da família *ras* é detectada apenas durante a fase de indução de lesões pré-neoplásicas (Dominguez-Malagon & Gaytan-Graham, 2001), embora no modelo do RH tenha sido apenas detectado um pequeno aumento da expressão do mesmo logo após a hepatectomia parcial (Porsch-Hallstrom et al., 1989). Isso talvez explique a ausência de proteção por parte do esqualeno constatada no presente estudo.

5- Referências

- BARTOLI, R., FERNANDEZ-BANARES, F., NAVARRO, E., CASTELLA, E., MANE, J., ALVAREZ, M., PASTOR, C., CABRE, E., GASSULL, M.A. Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E(2) synthesis. **Gut.**, v. 46, n. 2, p. 191-199, 2000.

- BROW, M. S., GOLDSTEIN, J. L. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v. 343, n. 1, p. 425-429, 1974.
- CROWELL, P. L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **J. Nutr.**, v. 129, p. 775S-778S, 1999.
- DESAI, K. N., WEI, H., LAMARTINIERE, C. A. The preventive and therapeutic potential of the squalene-containing compound, Roindex, on tumor promotion and regression. **Cancer Lett.**, v. 101, p. 93-96, 1996.
- DOMINGUEZ-MALAGON, H., GAYTAN-GRAHAM, S. Hepatocellular carcinoma: na update. **Ultrastruct Pathol.**, v. 25, n. 6, p. 497-516, 2001.
- ELSON, C. E., YU, S.G. The chemoprevention of cancer by mevalonate-derived constituent of fruits and vegetables. **J. Nutr.**, v. 124, p. 607-614, 1994.
- ELSON, C. E., PEFFLEY, D. M., HENTOSH, P. M. H. Isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis: potential application to cancer. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 221, n. 4, p. 294-311, 1999.
- ESPÍNDOLA, RM. Atividade quimiopreventiva da β -ionona e do geranil-geraniol em ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente". São Paulo, 2002. 104p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- ENZMANN, H., BOMHARD, E., IATROPOULOS, M. AHR. H.J., SCHLUELTER, G., WILLIAMS, G. M. Short- and intermediate-term carcinogenicity testing--a review. Part 1: the prototypes mouse skin tumour assay and rat liver focus assay. **Food Chem. Toxicol.**, v. 36, n. 11, 979-995, 1998.

- FAIRBAIN, D. W., OLIVE, P.L., O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Res.**, v. 339, p. 37-59, 1995.
- FARBER, E. The sequential analysis of liver cancer induction. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 605, p. 149-166, 1980.
- FARBER, E., SARMA, R. S. D. Biology of disease. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Lab. Invest.**, v. 56, p. 4-22, 1987
- GOLDSWORTHY, T. L., FRANSSON-STEEN, R., MARONPOT, R. R. Importance of and approaches to quantification of hepatocyte apoptosis. **Toxicol. Pathol.**, v. 24, n. 1, p. 24-35, 1996.
- GRASL-KRAUPP, B., RUTTKAY-NEDECKY, B., MULLAUER, L., TARTER, H., WOLFGANG, H., BURSCH, W., SCHULTE-HERMANN, R. Inherent increase of apoptosis in liver tumors: implications for carcinogenesis and tumor regression. **Hepatology**, v. 25, p. 906-912, 1997.
- HIGGINS, G. M., ANDERSON, R. M. Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. **Arch. Pathol.**, v. 12, p. 186-202, 1931.
- HSU, S. M., RAINE, L., FANGER, N. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29, p. 577-80, 1981.
- KATDARE, M., SINGHAL, K., TANAKA, S., IKEKAWA, T. Prevention of mammary preneoplastic transformation by naturally-occurring tumor inhibitors. **Cancer Lett.**, v. 111, p. 141-147, 1997.

- KONG, J., RINGER, D.P. Quantitative analysis of changes in cell proliferation and apoptosis during preneoplastic and neoplastic stages of hepatocarcinogenesis in rat. **Cancer Lett.**, v.105, p. 241-248, 1996.
- MIQUEL, K., PRADITES, A., FRAVE, G. Farnesol and geranylgeraniol induced actin cytoskeleton disorganization and apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells. **Biochem. Bioph. Res. Comm.**, v. 225, p. 869-876, 1996.
- MORENO, F.S., ROSSIELO, M. R., MANJESHWAR, S., NATH, R., RAO, P. M., RAJALAKSHIMI, S., SARMA, D. S. R. Effect of β -carotene on the expression of 3-hydroxi-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. **Cancer Lett.**, v. 96, p. 201-210, 1995.
- MURAKOSHI, M., NISHINO, H., TOKUDA, H., OWASHIMA, A., OKUZIMI, J., KITANO, H., IWASAKI, R. Inhibition by squalene of the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse-skin carcinogenesis. **Int. J. Cancer**, v. 56, n. 6, p. 950-952, 1992.
- NAKAMURA, Y., TONOGAI, Y., TSUMURA, Y., SHIBATA, T., UCHIYAMA, M. Effect of dietary squalene on the fecal steroid excretions and lipid levels of serum and liver in the rat. **Nut. Res.**, v. 17, n. 2, p. 243-257, 1997.
- NEWMARK, H. L. Squalene, olive oil, and cancer risk. **Ann NY Acad Sci.** v. 889, p. 103-203, 2000.
- OLIVE, P. L., BANATH, J. P., DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet" assay. **Radiat. Res.**, v. 122., p. 86-94, 1990.

- OLIVEIRA, V. N., MAZZANTINI, R. P., ONG, T. P., JORDÃO, J. A. A., VANNUCHI, H., MORENO, F. S. Absence of inhibitory effects of phenylacetate on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model of carcinogenesis. **Int. J. Med. Biol. Environ.**, v. 29, p. 179-184, 2001.
- ONG, T., ESPÍNDOLA, R., MOURA, A., TENUTA-FILHO, A., HEIDOR, R., DAGLI, M., MORENO, F. Ação quimiopreventiva do farnesol e do geraniol em ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente" (RH). **Ver. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 37, n. 1, 2001.
- PORSCHE-HALLSTROM, I., BLANCK, A., ERIKSSON, L.C., GUSTAFSSON, J.A. Expression of the c-myc, c-fos, and c-rasHa protooncogenes during sex-differentiated rat liver carcinogenesis in the resistant hepatocyte model. **Carcinogenesis**, v.10, n.10, p.1793-1800, 1989.
- QUESNEY-HUNEEUS, V., GALICK, H. A., SIPERSTEIN, M. D., ERICKSON, S. K., SPENCER, T. A., NELSON, J. A. The dual role of mevalonate in the cell cycle. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 378-385, 1983.
- RAO, C. V., NEWMARK, H. L., REDDY, B. S. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 2, p. 287-290, 1998.
- REDDY, B. S. Micronutrients as chemopreventive agents. In: STEWART, B.W., MCGREGOR, D., KLEIHUES, P. Principles of chemoprevention. LYON, **IARC. Sci. Publ.**, n. 139, p. 221-236, 1996.
- SAWAKI, M., HATTORI, A., TSUZUKI, N., ENOMOTO, K. Chronic liver injury promotes hepatocarcinogenesis of the LEC rat. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 331-335, 1998.

- SEMPLE-ROBERTS, E., HAYES, M. A., ARMSTRONG, D., BECKER, R. A., RACZ, W. J., FARBER, E. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. **Int. J. Cancer**, v. 40, p. 643-645, 1987.
- SINGH, N. P., MCOOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell., Res.**, v. 175, p.184-191, 1988.
- SMITH, T. J., YANG, G., SERIL, D. N., LIAO, J., KIM, S. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 4, p. 703-706, 1998.
- SMITS, R., KARTHEUSER, A., JAGMOHAN-CHANGUR, C. B., LEBLANC, A., DEVRIES, H., VAN KAREN, J. H., WILLIAMSON, W., EDELMANN, R., KUCHERLAPATI, P. M., KHAN, R. Loss of Apc and the entire chromosome 18 but absence of mutation at the ras and tp53 gene in intestinal tumors from Apc1638, a mouse model for APC-driven carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 2, p.321-327, 1997.
- SOLT, D., FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. **Nature**, v. 263, p. 701-703, 1976.
- SPORN, M. B. & SUH, N. Chemoprevention of cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, n.3, p. 525-530, 2000.
- STRANDBERG, T. E., TILVIS, R. S., MIETTINEN, T. A. Metabolism variables of cholesterol during squalene feeding in humans: comparison with cholestyramine treatment. **J Lipid Res**, v. 31, p.1637-1643, 1990.
- TICE, R. R., ANDREWS, P. W., HIRAI, O., SINGH, N. P. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluation intercellular differences in DNA damage and repair. **Basic Life Sci.**, v. 53, p. 291-301, 1990.

- TICE, R. R., ANDREWS, P. W., HIRAI, O., SINGH, N. P. The single cell (SCG) assay: an electrophoretic for detection of DNA damage in individual cell. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 283, p. 157-164, 1991.
- VAN DUREN, B. L. & GOLDSCHIMIDT, B.M. Co-carcinogenic and tumor-promotion agents in tobacco carcinogenesis. **J. Natl Cancer Inst.**, v. 56, p.1237-1342, 1976.
- ZAR, J. H. **Bioestatistical Analysis**, 2 ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 718, 1984.

TABELAS

TABELA 1 – Peso corpóreo inicial, ganho de peso, peso hepático relativo de ratos Wistar submetidos ao modelo do “hepatócito resistente”, tratados com esqualeno, óleo e água.

Tratamento	Número de animais	Peso Final* (g)	Ganho de Peso* (g)	Peso Hepático Relativo*
Esqualeno 100	11	255,4±25,8	182,3±24,8	3,7±0,7
Esqualeno 150	8	243,5±24,2	171,5±23,2	3,5±0,6
Óleo	10	244,2±27,7	170,7±25,2	3,8±0,9
Água	9	226,0±26,1	154,3±25,9	3,5±0,5

*Os valores representam, respectivamente, média e desvio-padrão.

A significância entre as médias foi determinada pelo *t* de Student.

TABELA 2 - Quantificação lesões pré-neoplásicas (LPN) visíveis à macroscopia de ratos Wistar submetidos ao modelo do “hepatócito resistente” tratados com esqualeno, óleo e água.

atamento	Nº de ratos c/ nódulos	Incidência (%)	Nº total nódulos	Multiplicidade (Nº médio LPN/ animais c/LPN)*
Esqualeno 100	10/11	91,0	282	15,8± 20,9
Esqualeno 150	6/8	75	328	59,2± 77,1
Óleo	8/10	80	508	63,5± 72,3
Água	9/9	100	473	58,1± 78,1

*Os valores representam, respectivamente, média e desvio-padrão.

A significância entre as médias foi determinada pelo teste Manny-Whitney.

A comparação a incidência foi determinada pelo teste exato de Fisher.

TABELA 3 - Quantificação das Lesões pré-neoplásicas (LPN) positivas para GST-P, no fígado de ratos Wistar submetidos ao modelo do “hepatócito resistente”, tratados com esqualeno, óleo e água.

Tratamento	Nº. efetivo de animais	Focos GST-P ⁺	
		Número (focos/cm ²)*	Área Agregada (mm ² /cm ²)*
Esqualeno 100	11	64,8 ± 21,3	11,9 ± 12,9
Esqualeno 150	8	61,0 ± 20,3	23,6 ± 25,7
Óleo	10	65,4 ± 24,7	21,1 ± 23,6
Água	9	78,5 ± 20,9	19,1 ± 14,2

* Os valores representam, respectivamente, média e desvio-padrão.

A significância entre as médias foi determinada pelo teste Manny-Whitney.

TABELA 4 – Índice de marcação (%/IM) de hepatócitos positivos para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e índice apoptótico (%/IA) no fígado de ratos Wistar submetidos ao modelo do “hepatócito resistente”, tratados com esqualeno, óleo e água.

Grupo	Número de animais	Índice de marcação PCNA (%/IM)		Índice apoptótico (%/IA)	
		Área ao redor das lesões	Área de lesões pré-neoplásicas	Área ao redor das lesões	Área de lesões pré-neoplásicas
Esqualeno 100	11	4,88±3,76	0,08±0,11 ^a	1,07±1,01	1,78±1,01 ^a
Esqualeno 150	8	7,32±5,36	0,05±0,09	1,29±1,22	2,69±1,93
Óleo	10	4,55±4,65	0,15±0,14 ^a	1,00±0,56	1,05±1,03
Água	9	6,45±4,78	0,06±0,09	0,55±0,45	3,49±3,20 ^a

* Os valores representam, respectivamente, média e desvio-padrão.

^a= diferenças estatisticamente significantes ($P \leq 0,05$) quando comparados ao IM das áreas “surrounding”, determinado pelo teste Manny-Whitney.

TABELA 5 – Migração da Cauda, Intensidade da Cauda e Momento da Cauda de cometas em ratos tratados com esqualeno, óleo e água, submetidos ao modelo do “hepatócito resistente”.

Grupo	Número de animais	Migração da Cauda*	Intensidade da Cauda *	Momento da Cauda*
Esqualeno 100	11	17,7±6,2	21,0±9,0	5,4±2,4
Esqualeno 150	8	17,0±4,0	20,9±8,0	5,1±2,3
Óleo	10	16,2±1,7	19,8±7,5	4,9±0,5
Água	9	18,2±3,8	26,0±8,3	5,5±3,0

* Os valores representam, respectivamente, média e desvio padrão.

A significância entre as médias foi determinada pelo teste Manny-Whitney.

FIGURAS

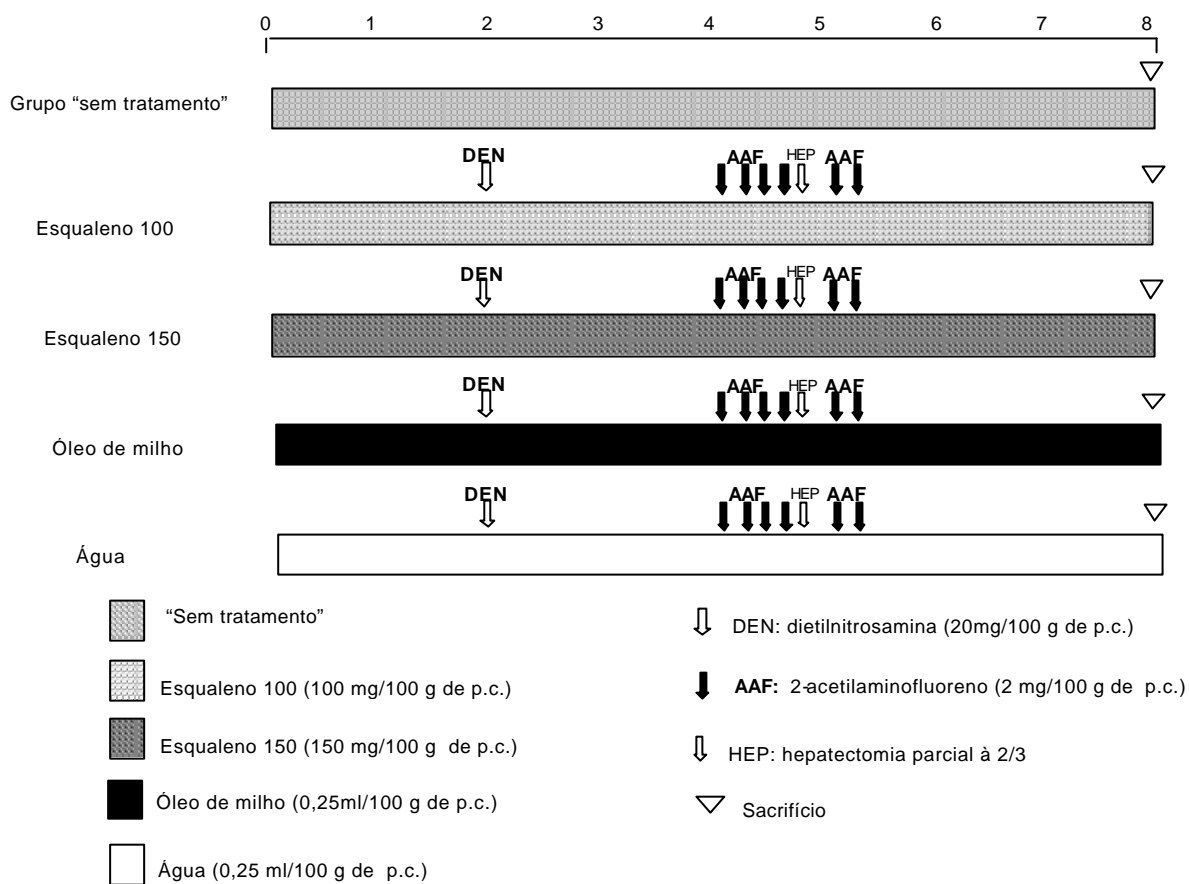


Figura 1- Protocolo experimental

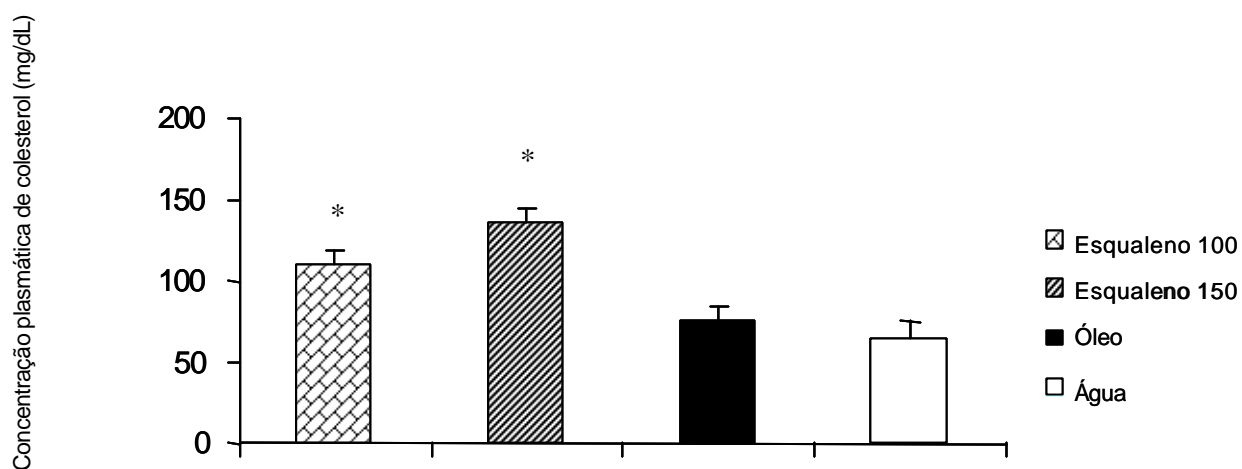


FIGURA 2 – Concentração plasmática de colesterol de ratos Wistar submetidos ao modelo do RH e tratados com esqualeno, óleo e água. *diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), determinada pelo teste t de Student quando comparados ao grupo Óleo.

VI – CONCLUSÃO

- Porque o esqualeno foi absorvido e não houve alterações em área e número de lesões pré-neoplásicas, concluiu-se que o esqualeno não apresentou efeito quimio preventivo quando administrado nas doses de 100 e 150 mg por 100 g de p.c. na hepatocarcinogênese química em ratos submetidos ao modelo do “hepatócito resistente”.

IV – REFERÊNCIAS

- ALBERTS, D. S., GARCIA, D. J. An overview of clinical cancer chemoprevention studies with emphasis on positive phase III studies. **J. Nutr.**, v. 125, p. 692s-697s, 1995.
- AMES, B. N., GOLD, L. S., WILLETT, W. C. The causes and prevention of cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 92, p. 5258-5265, 1995.
- BACH, T. Some new aspects of isoprenoids biosynthesis in plants – A review. **Lipids**, v. 30, p. 191-202, 1995.
- BANNASCH, P., MOORE, M. A., KLIMEK, F., ZERBAN, H. Biological markers of preneoplastic foci and neoplastic nodules in rodent liver. **Toxicol. Pathol.**, v. 10, p. 19-34, 1982.
- BANNASCH, P. Preneoplastic lesions as end-points in carcinogenicity testing .I. Hepatic preneoplasia. **Carcinogenesis**, v. 7, p. 689-695, 1986.
- BANNASCH, P., ENZMANN, H., KLIMEK, F., WEBER, E., ZERBAN, H. Significance of sequential cellular changes inside and outside foci altered hepatocytes during hepatocarcinogenesis. **Toxicol. Pathol.**, v. 17, p. 617-629, 1989.
- BANNASCH, P., ZERBAN, H. Tumors of liver. In: **Pathology of Tumors in Laboratory Animals**. V. S. Turusov, U. Mohr, Eds. Lyon, IARC Cientific Publications v. 99, n. 1, p. 199-240, 1990.
- BANNASCH, P., ZERBAN, H. Predictive value of hepatic preneoplastic lesions as indicators of carcinogenic response. In: VAINIO, H., MAGEE, P.N., Mc GREGOR, D.

-
- B., Mc MICHAL, A.J.. Mechanism of Carcinogenesis in Risk Indetification. LYON, **IARC. Sci. Publ.**, n. 116, p. 389- 427, 1992.
- BARTOLI, R., FERNANDEZ-BANARES, F., NAVARRO, E., CASTELLA, E., MANE, J., ALVAREZ, M., PASTOR, C., CABRE, E., GASSULL, M.A. Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E(2) synthesis. **Gut.**, v. 46, n. 2, p. 191-199, 2000.
 - BERTRAM, J. S., KOLONEL, L. N., MEYSKENS Jr, F. L. Rationale and strategies for chemoprevention of cancer in humans. **Cancer Res.**, v. 47, p. 3012-3031, 1987.
 - BOS, J.L., KREIJL, C.F. Genes and genes products that regulate proliferation: Critical targets in carcinogenesis. In: VAINIO, H., MAGEE, P. N., Mc GREGOR, D. B., Mc MICHAL, A.J.. Mechanism of Carcinogenesis in Risk Indetification. LYON, **IARC. Sci. Publ.**, n. 116, p. 57-65, 1992.
 - BUTLER, W. H., HEMSALL, V., STEWART, M.C. Histochemical studies on the early proliferating lesions iduced in the rat liver by aflatoxin. **J. Path.**, v. 133 p. 325-340, 1981.
 - CAYAMA, E., TSUDA, H., SARMA, D. S., FARBER, E. Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation. **Nature (Lond)**, v. 60, p. 60-62, 1978.
 - COHEN, S. M., ELLWEIN, L. B. Cell proliferation and carcinogenesis. **Science**, v. 249, p. 1007-1011, 1990.
 - COHEN, S. M., ELLWEIN, L. B. Genetic erros, cell proliferation and carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 51, p. 6493-6505, 1991.
 - CROWELL, P. L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **J. Nutr.**, v. 129, p. 775S-778S, 1999.

-
- DESAI, K. N., WEI, H., LAMARTINIERE, C. A. The preventive and therapeutic potential of the squalene-containing compound, Roidex, on tumor promotion and regression. **Cancer Lett.**, v. 101, p. 93-96, 1996.
 - DOOL, R., PETO, R. The causes of cancer. **INCI**, v. 66, p. 1191-1199, 1981.
 - DRAGAN, Y. P., PITOT, H. C. The role of stages of initiation and promotion in phenotypic diversity during hepatocarcinogenesis in the rat. **Carcinogenesis**, v. 13, p. 739-750, 1992.
 - DRAGSTED, L. O., STRUBE, M., LARSEN, J. C. Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. **Pharmacol Toxicol.**, v. 72, p. 116s-135s, 1993.
 - ELDRIDGE, S. A., BUTTERWORTH, B. E., GOLDSWORTHY, T. L. Proliferation cell nuclear antigen: a marker for hepatocellular proliferation in rodents. **Environ Health Perspect.**, v. 3, p. 211-218, 1993.
 - ELSON, C. E., YU, S. G. The chemoprevention of cancer by mevalonate-derived constituents of fruits and vegetables. **J.Nutr.**, v. 124, p. 607-614, 1994.
 - ELSON, C. E., MALTZMAN, T. H., BOSTON, J. L., TANNER, M. A., GOULD, M. N. Anticarcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 9, p. 331-332, 1998.
 - ELSON, C. E., PEFFLEY, D. M., HENTOSH, P., MO, H. Isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis: Potential application to cancer. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 221, p. 294-311, 1999.

-
- ENZMANN, H., BANNASCH, P. Potencial significance of phenotypic heterogeneity of focal lesions at different stages in hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 1607-1612, 1987.
 - ESPÍNDOLA, R. M. Atividade quimiopreventiva da β -ionona e do geranil-geraniol em ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente". São Paulo, 2002. 104p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
 - FAIRBAIN, D. W., OLIVE, P. L., O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Res.**, v. 339, p. 37-59, 1996.
 - FARBER, E., SARMA, R. S. D. Biology of disease. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Lab. Invest.**, v. 56, p. 4-22, 1987.
 - FARBER, E. Cancer development and its natural history. A cancer prevention perspective. **Cancer**, v. 62, p. 1676-1679, 1988.
 - FOLEY, J. F., DIETRICH, D. R., SWENBERG, J. A., MARONPOT, R. R. Cell nuclear antigen (PCNA) in rat tissue by an improved immunohistochemical procedure. **J. Histotechnol.**, n. 4, v. 14, p. 237-241, 1991.
 - GESHER, A., PASTORINO, U., PLUMMER, S. M., MANSON, M. M. Supresion of tumor development by substances derived from the diet-mechanisms and clinical implications. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 45, p. 1-12, 1998.
 - GOLDSTEIN J. L., BROWN, M. S. Regulation oh the mevalonate pathway. **Nature**, v. 343, p. 425-30, 1990.
 - GRASL-KRAUPP, B., LUEBECK, G., WAGNER, A., LOW-BASELLI, A., GUNST, M., WALDOHOR, T., MOOLGAVKAR, S., SCHULTE-HERMANN, R. Quantitative

- analysis of tumor initiation in rat liver: role of cell replication and cell death (apoptosis). **Carcinogenesis**, v. 21, n. 7, p. 1411-1421, 2000.
- HANIGAN, M. H., PITOT, H. C. Gamma-glutamyl transpeptidase; its role in hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 6, p. 165-172, 1985.
 - HARTMANN, A., SPEIT, G. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. **Environm. Mol., Mutagen**, v. 23, p. 299-305, 1994.
 - HE, L., MO, H., HADISUSUSILO, S., QURESHI, A. A., ELSON, C. E. Isorpenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. **J. Nutr.**, v. 127, p. 668-74, 1997.
 - ITO, N., TSUDA, H., TATEMATSU, M., INOUE, T., TAGAWA, Y., AOKI, T., UWAGAWA, S., KAGAWA, M., OGISO, T., MASUI, T., IMAIDA, K., ASAMOTO, M. Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats: an approach for a new medium-term bioassay system. **Carcinogenesis**, v. 9, p. 387-394, 1988.
 - ITO, N., IMAIDA, T., HASEGAWA, R., TSUDA, H. Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 19, p. 385-415, 1989.
 - ITO, N., IMAIDA, K., ASAMOTO, M., SHIRAI, T. Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats. **Mutation Res.**, v. 462, p. 209-217, 2000.
 - KAUFMANN, W. K., RICE, J. M., MACKENZIE, S. A., SMITH, G. J., WENK, M. L., DEVOR, D. QAQISH, B. F., KAUFMAN, D. G. Proliferation of carcinogen-damaged hepatocytes during cell-cycle-dependent initiation of hepatocarcinogenesis in the rat. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1587-1593, 1991.

-
- KOOLMAN, J., ROHM, K. Isoprenoids. In: Color Atlas of Biochemistry, Koolman, J., Rohm, K., Thieme, Stuttgart, p. 50-1, 1996.
 - LATRY, L. E., ZHANG, Z., CRIST, K. A., WANG, Y., HARA, M., ZEECK, A., LUBET, R. A., YOU, M. Chemopreventive efficacy of promoting farnesyltransferase inhibitors. **Exp. Lung Res.**, v. 26, n. 9, p. 773-779, 2000.
 - MILNER, J. A. Strategies for cancer prevention: the role of diet. **Br Jour Nutr.**, v. 87, n. 2, p. 265-272, 2002.
 - MORENO, F. S., RIZZI, M. B. S. L., DAGLI, M. L. Z., PENTEADO, M. V. C. Inhibitory effects of β -carotene on preneoplastic lesion induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 10, p. 1817-22, 1991.
 - MORENO, F. S., ROSSIELO, M. R., MANJESHWAR, S., NATH, R., RAO, P. M., RAJALAKSHIMI, S., SARMA, D. S. R. Effect of β -carotene on the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. **Cancer Lett.**, v. 96, p. 201-210, 1995.
 - MOORE, M. A., KITAGAWA, T. Hepatocarcinogenesis in the rat; the effect of promoters and carcinogens in vivo or in vitro. **Int. Rev. Cytol.**, v. 101, p. 125-173, 1986.
 - MURAKOSHI, M., NISHINO, H., TOKUDA, H., OWASHIMA, A., OKUZIMI, J., KITANO, H., IWASAKI, R. Inhibition by squalene of the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse-skin carcinogenesis. v. 56, n. 6, p. 950-952, 1992.

-
- NAKAMURA, Y., TONOGAI, Y., TSUMURA, Y., SHIBATA, T., UCHIYAMA, M. Effect of dietary squalene on the fecal steroid excretions and lipid levels of serum and the liver in the rat. **Nut. Res.**, v. 17, n. 2, p. 243-257, 1997.
 - NEWMARK, H. L. Squalene, olive oil, and cancer risk. **Ann NY Acad Sci.** v. 889, p.103-203, 2000.
 - OHIZUMI, H., MASUDA, Y., NAKAJO, S., SAKAI, I., OHSAWA, S., NAKAYA, K. Geranylgeraniol in potent inducer of apoptosis in tumor cells. **J. Biochem.**, v. 117, p. 11-13, 1995.
 - OMENN, G. S. Micronutrients (vitamins and minerals) as cancer-preventive agents. In: STEWART, B. W., MCGREGOR, D., KLEIHUES, P. Principles of chemoprevention. LYON, **IARC. Sci. Publ.**, n. 139, p. 33-46, 1996.
 - ONG, T., ESPÍNDOLA, R., MOURA, A., TENUTA-FILHO, A., HEIDOR, R., DAGLI, M., MORENO, F. Ação quimiopreventiva do farnesol e do geraniol em ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente" (RH). **Ver. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 37, n. 1, 2001.
 - PERAINO, C., FRY, R. J., STAFELLEDT, E. Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in rat by 2-acetylaminofluorene. **Cancer Res.**, v. 13, n. 10, p. 1506-1512, 1971.
 - PEZZUTO, J. M. Plant derived anticancer agents. **Biochem. Pharmacol.**, v. 53, p.121-133, 1997.
 - PITOT, H. C., CAMPBELL, H. A., MARONPOT, R., BAWA, N., RIZVI, T. A., XU, Y. H., SARGENT, L., DRAGAN, Y., PYRON, M. Critical parameters in quantification of stages of initiation, promotion, and progression in one model of hepatocarcinogenesis in the rat. **Toxicol. Pathol.**, v. 17, p. 594-612, 1989.

-
- PITOT, H. C., DRAGAN, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **Mech. Carcin. - The FASEP J.**, v. 5, p. 2280-2286, 1991.
 - PITOT, H.C.. A molecular biology of carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 72, p. 962- 970, 1993.
 - PITOT, H. C., DRAGAN, Y. P., TEEGUARDEN, J., HSIA, S., CAMPBELL, H. Quantification of multistage carcinogenesis in rat liver. **Toxicol Pathol.**, v. 24, p. 199-28, 1996.
 - POTTER, J. D., STEINMETZ, K. Vegetables, fruit, and phytoestrogens as preventive agents. In: STEWART, B.W., MCGREGOR, D., KLEIHUES, P. Principles of chemoprevention. LYON, **IARC. Sci. Publ.**, n. 139, p. 61-90, 1996.
 - RAO, C. V., NEWMARK, H. L., REDDY, B. S. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 2, p. 287-290, 1998.
 - REDDY, B. S. Micronutrients as chemopreventive agents. In: STEWART, B.W., MCGREGOR, D., KLEIHUES, P. Principles of chemoprevention. LYON, **IARC. Sci. Publ.**, n. 139, p. 221-236, 1996.
 - REDDY, B. S., WANG, C. X., SAMAHA, H., LET, R., STEELE, V. E., KELLOFF, G. J., RAO, C. V. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. **Cancer Res.**, v. 67, p. 415-422, 1997.
 - RIBOLI, E., NORAT, T. Cancer prevention and diet: opportunities in Europe. **Public Health Nutr.**, v. 4, n. 2B, p. 475-484, 2001.
 - ROGERS, A. E., ZEISEL, S. H., GROOPMAN, J. Diet and carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 2205-2217, 1993.

-
- SATOH, K., KITAHARA, A., SOMA, Y., INABA, Y., HATAYAMA, I., SATO, H. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase; a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. **Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash)**, v. 82, p. 3964-3968, 1985.
 - SCHULTE-HERMANN, R. Tumor promotion in the liver. **Arch. Toxicol.**, v. 57, p. 147-158, 1985.
 - SCHULTE-HERMANN, R., TIMMERMANN-TROSIENER, I., BARTHEL, G., BURSCH, W. DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. **Cancer Res.**, v. 50, p. 5127-5135, 1990.
 - SCHULTE-HERMANN, R., BURSCH, W., GRASL-KRAUPP, B., MÜLLAUER, L., RUTTKAY-NEDECKY, B. Apoptosis and multistage carcinogenesis in rat liver. **Mutation Res.**, v. 333, p. 81-87, 1995.
 - SEMPLE-ROBERTS, E., HAYES, M. A., ARMSTRONG, D., BECKER, R. A., RACZ, W. J., FARBER, E. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. **Int. J. Cancer**, v. 40, p. 643-645, 1987.
 - SILVEIRA, E. R., NAVES, M. M., VANNUCCHI, H., JORDAO JUNIOR, A. A., DAGLI, M. L., MORENO, F. S. Vitamin A and all-trans and 9-cis retinoic acids inhibit cell proliferation during the progression phase of hepatocarcinogenesis in Wistar rats. **Nutr Cancer**, v. 39, n. 2, p. 244-251, 2001.

-
- SMITH, T. J., YANG, G., SERIL, D. N., LIAO, J., KIM, S. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 4, p. 703-706, 1998.
 - SMITH, D., ESPINO-MONTORO, A., PEREZ-JIMENEZ, F., PEDRO-BOTET, J., PEREPEREZ, J., ORDOVAS, J.M. Effect of a high saturated fat and cholesterol diet supplemented with squalene or β -sitosterol on lipoprotein profile in F1B hamsters. **Nutrition Res.**, v. 20, n. 9, p. 1309-1318, 2000.
 - SOLT, D., FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. **Nature**, v. 263, p. 701-703, 1976.
 - SPORN, M. B., DUNLOP, N. M., NEWTON, D. L., SMITH, J. M. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). **Fedn. Proc.**, v. 35, p. 1332-1338, 1976.
 - SPORN, M. B. & SHU, N. Chemoprevention of cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 525-530, 2000.
 - STARK, A. H., MADAR, Z. Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. **Nutr. Rev.**, v. 60, n. 6, p. 170-176, 2002.
 - STERMER, B. A., BIANCHINI, G. M., KORTH, K. L. Regulation of HMGCoA reductase activity in plants. **J. Lipid. Res.**, v. 35, p. 1130-1140, 1994.
 - STONER, G. D., MORSE, M. A., KELLOFF., G. J. Perspectives in cancer chemoprevention. **Environ. Health Perspect.**, v. 105, n. 4, p. 945-954, 1997.
 - STRANDBERG, T. E., TILVIS, R. S., MIETTINEN, T. A. Metabolism variables of cholesterol during squalene feeding in humans: comparison with cholestyramine treatment. **J Lipid Res.**, v. 31, p. 1637-1643, 1990.

-
- STRYER, L. Biosynthesis of membrane lipids and steroid hormones. In: Biochemistry, L. Stryer, ed., W. H. Freeman and Co., NY, p. 547-554, 1988.
 - TAMINI, R. M., LAGIOU, P., ADAMI, H. O., TRICHOPOULOSI, D. Prospects for chemoprevention of câncer. **J Int. Med.**, v. 251, n. 4, p. 286-300, 2002.
 - TATEMATSU, M., NAGAMINE, Y., FARBER, E. Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. **Cancer Res.**, v. 41, n. 11, p. 5049-5058, 1983.
 - TERRY, P., TERRY, J. B., WOLK, A. Fruit and vegetable consumption in the prevention of cancer: an update. **J. Inter. Med.**, v. 250, n. 4, p. 280-290, 2001.
 - TICE, R.R. Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. In: **Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change.** (F.M. Butterworth, ed.), Plenum Press, New York, 1995.
 - TILVIS R. S., MIETTINEM, T. A. Absorption and metabolic fate of dietary H-squalene in the rat. **Lipids**, v. 18, p. 233-238, 1982.
 - VAN DUREN, B. L. & GOLDSCHMIDT, B.M. Co-carcinogenic and tumor-promotion agents in tobacco carcinogenesis. **J. Natl Cancer Inst.**, v. 56, p.1237-1342, 1976.
 - VENNIT, S. Mechanisms of carcinogenesis and individual susceptibility to cancer. **Clin. Chem.**, v. 40, p. 1421-1425, 1994.
 - VOZIYAM, P. A., HAUG, J. S., MELNYKOVYCH, G. Mechanisms of farnesol cytotoxicity: Further evidence for the role of PKC-dependent signal transduction in farnesol – induced apoptotic cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 212, p. 479-86, 1995.
 - WARGOVICH, M. J., JIMENEZ, A., MCKEE, K., STEELE, V. E., VELASCO, M., WOODS, J., PRICE, R., GRAY, K., KELLOF, G. J. Efficacy of potential

chemopreventive agents on rats colon aberrant crypt formation and progression.

Carcinogenesis, v. 21, n. 6, p. 1149-1155, 2000.

- WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. **Cancer Res.**, v. 45, p. 1-8, 1985.
- WATTENBERG, L. W., SPARNINS, V. L. BARANY, G. Inhibition of N-Nitrosiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. **Cancer Res.**, v. 49, p. 2689-2692, 1989.
- WRIGHT, S. C. ZHONG, J, LARRICK, J. W. Inhibition of apoptosis as a mechanisms of tumor promotion. **FASEB, J.**, v. 8, p. 654-660, 1994.