

DIFERENCIAÇÃO CELULAR: IMPORTÂNCIA NA HEPATOCARCINOGENESE E PAPEL MODULADOR DO β -CAROTENO

Cellular Differentiation: Importance in Hepatocarcinogenesis and Modulator Role of β -Carotene

Maria Margareth Veloso Naves¹ e Fernando Salvador Moreno²

Resumo

Esta revisão focaliza a relação entre a diferenciação das células ovais e a origem celular do câncer hepático, bem como os estudos recentes sobre a ação do β -caroteno na diferenciação celular. As denominadas células ovais, que proliferam durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese, são células progenitoras bipotentes que podem se diferenciar em hepatócitos e em células epiteliais biliares, conforme demonstrado em modelos *in vivo* de diferenciação celular hepática. Postula-se que o câncer hepático originar-se-ia das células ovais, por bloqueio irreversível do processo de diferenciação, resultante da ação de hepatocarcinógenos. Desse modo, seriam geradas células imaturas transformadas que deteriam potencial proliferativo e imortalidade, em contraposição à teoria de que o câncer desenvolver-se-ia a partir da “desdiferenciação” dos hepatócitos. Descreve-se que o β -caroteno (e outros carotenóides sem atividade pró-vitáminica A) é capaz de induzir a diferenciação celular, em modelos *in vitro*. Além disso, foi observado, *in vivo*, que o carotenóide reduziu o número de células ovais remanescentes (ao final do período experimental), tanto em modelo de hepatocarcinogênese química quanto de diferenciação celular hepática. Estes achados sugerem que o β -caroteno pode favorecer a diferenciação terminal completa das células ovais, com implicações na quimioprevenção do câncer hepático.

Palavras-chave: diferenciação celular; células hepáticas; carcinogênese; quimioprevenção; células ovais; β -caroteno.

Local de realização do trabalho: Laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Bloco 14, Av. Prof. Lineu Prestes 580, CEP 05508-900, São Paulo, Brasil. Tel.: (11) 38183630, FAX: (11) 38154410, E-mail: rmoreno@usp.br

1- Nutricionista, Doutora em Ciência dos Alimentos/Nutrição Experimental- USP, Professor Adjunto e Coordenadora do Laboratório

de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás

2- Médico, Doutor em Clínica Médica, Professor Associado e Coordenador do Laboratório de Nutrição, Dieta e Câncer da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

Apoio financeiro: CAPES (PICDT), CNPq (processo nº 301262/85-3) e FAPESP (processo nº 1996/7566-2)

Abstract

This review focuses the relationship between oval cell differentiation and the cellular origin of hepatic cancer, as well as the recent studies on the action of β -carotene in cellular differentiation. Oval cells proliferate in the liver during the early stages of hepatocarcinogenesis, with the capability to differentiate to both hepatocytes and biliary duct cells, as demonstrated by in vivo models of hepatic cellular differentiation. Hepatic cancer can be derived from oval cells after the exposure to hepatocarcinogens, by an irreversible block in the process of normal differentiation, and generation of immortal transformed cells with proliferative potential. It has been demonstrated, in in vitro models, that β -carotene (and other carotenoids without provitamin A activity) induces cellular differentiation. Moreover, it has been observed in in vivo models of hepatocarcinogenesis and of cellular differentiation, that the carotenoid reduces the number of oval cells at the end of the experimental period. These findings indicate that β -carotene can promote complete terminal differentiation of oval cells and suggest that these effect may have implications for chemoprevention of hepatic cancer.

Key words: cell differentiation; hepatic cells; carcinogenesis; chemoprevention; oval cells; β -carotene.

Introdução

A diferenciação celular constitui um processo biológico complexo e vital, uma vez que regula a expressão de um grande número de genes ligados a funções tecido-específicas e controla a proliferação celular. O processo de diferenciação compreende diversas etapas programadas geneticamente¹. Dentre elas, destacam-se: a proliferação de células progenitoras ou células-tronco (*stem cells*), imortais e que respondem a estímulo mitogênico; a ativação e/ou repressão de inúmeros genes; a expressão de proteínas de determinadas linhagens, que mediam funções biológicas específicas; a repressão progressiva da capacidade de responder a fatores mitogênicos; e por fim, a diferenciação terminal completa, associada à perda irreversível do potencial proliferativo.

A carcinogênese, por sua vez, é caracterizada pela produção de clones de células com alterações genéticas e epigenéticas, comumente associadas com a expressão e função anormais de proto-oncogenes e/ou antioncogenes, que resultam, sobretudo, em perda do controle sobre a diferenciação e proliferação celulares. Estes clones exibem propriedades típicas de células que não sofreram diferenciação terminal completa, ou seja, mantêm a

imortalidade e capacidade de responder a estímulo proliferativo. Segundo esta perspectiva, considera-se o câncer uma doença de diferenciação¹⁻⁴.

Por outro lado, postula-se que no fígado adulto, as denominadas células ovais (pequenas células com núcleo ovóide), que proliferam durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese, são células progenitoras que podem se diferenciar em hepatócitos, bem como dar origem ao câncer hepático⁵. (Figura 1)

Em nossos estudos de carcinogênese experimental no modelo do hepatócito resistente (modelo RH)⁶⁻⁹, observamos que o β -caroteno (carotenóide com atividade pró-vitamínica A) reduziu o número de células ovais remanescentes (ao final do período experimental). Este achado sugere que o carotenóide pode favorecer a diferenciação celular hepática, o que poderia explicar o papel protetor do carotenóide contra lesões pré-neoplásicas no fígado, constatado nos referidos estudos. (Tabela 1)

Neste contexto, objetiva-se revisar a relação entre a diferenciação das células ovais e o câncer hepático, e o papel do β -caroteno na diferenciação celular, como um eventual mecanismo de ação do carotenóide na quimioprevenção do câncer.

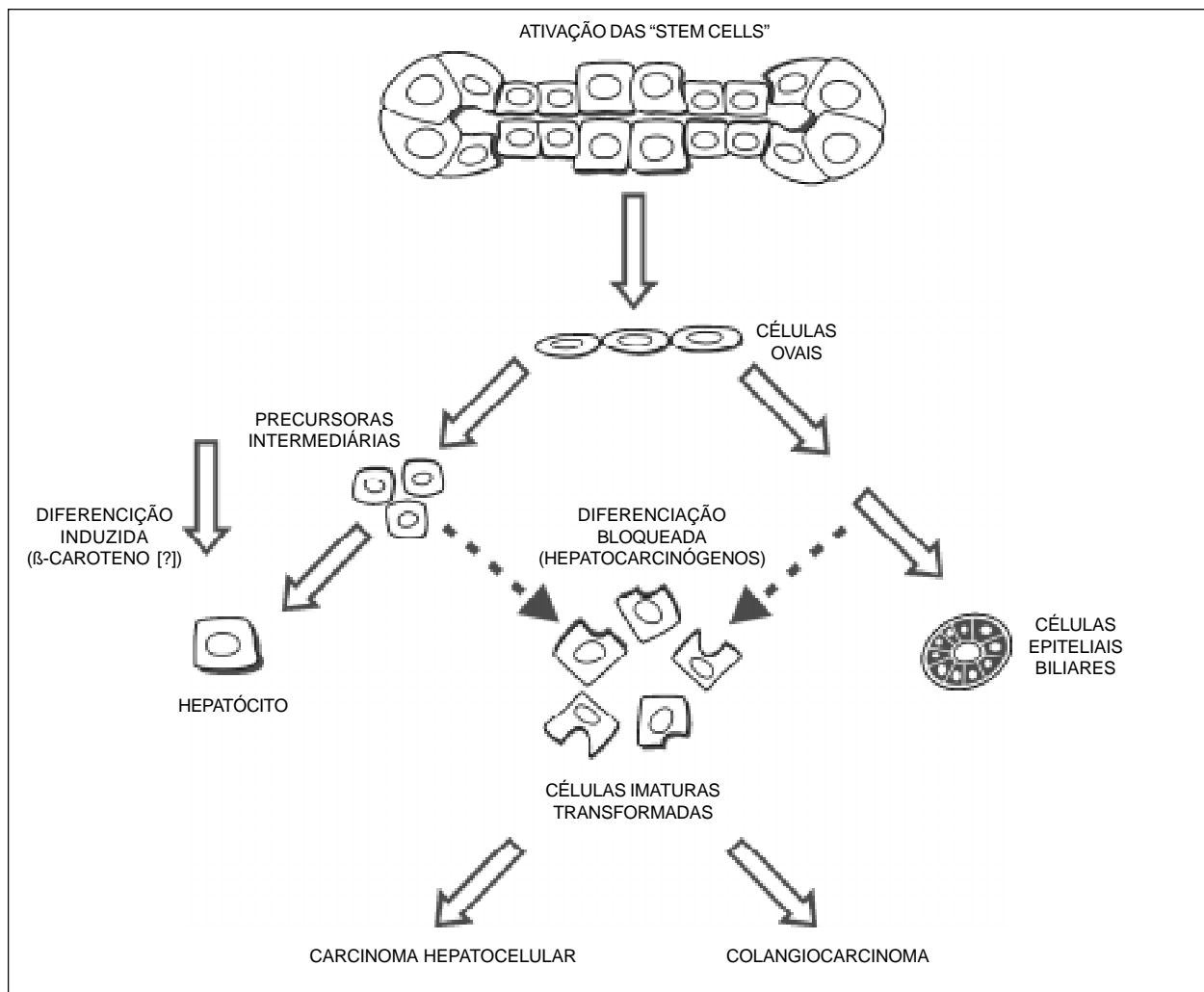


Figura 1- Esquema representativo da natureza diferenciativa bipotente das células ovas, ilustrando também o potencial destas células em dar origem ao câncer hepático e a eventual ação quimiopreventiva do β -caroteno via indução da diferenciação terminal completa das células ovas.

Células Ovas

Células ovas constitui um termo genérico usado para designar uma população de células epiteliais não-parenquimatosas, de pequeno tamanho (volume aproximado de 2/5 do hepatócito maduro), com citoplasma escasso e núcleo ovóide, que proliferam, no fígado de um organismo adulto, a partir da região da tríade portal e a seguir invadem o parênquima, durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese experimental e humana, ou na regeneração hepática após exposição a agentes tóxicos¹⁰⁻¹⁵.

As células ovas foram descritas primeiramente por Opie¹⁶ e a terminologia "células ovas" introduzida por Farber¹⁷. Desde então, a presença destas células tem sido relatada em diferentes modelos de hepatocarcino-

gênese química experimental¹⁰. Particularmente, há cerca de duas décadas se tem postulado um papel das células ovas na regeneração e carcinogênese hepatocelulares, o que ainda persiste como uma questão de considerável controvérsia¹⁸⁻²².

A origem das denominadas células ovas também constitui um assunto polêmico. Todavia, evidências sugerem que no fígado de roedores adultos, as células ovas são derivadas de um compartimento de células progenitoras (*stem cells*), possivelmente localizado nos canalículos biliares terminais, designados canais de Hering, e/ou nas regiões periductulares^{14,19,20,23,24}.

As *stem cells* (células-tronco) são células progenitoras, multipotentes, responsáveis pela reposição celular em determinado órgão, com capacidade de se dividirem para produzir duas

Tabela 1. Efeitos do β -Caroteno (BC) administrado a ratos submetidos ao modelo RH¹ de hepatocarcinogênese

ESTUDO (referência)	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	EFEITOS	
		Quimiopreventivos ²	Células ovais ³
Moreno <i>et al.</i> (6)	BC ou CO ⁴ administrados antes ou após a iniciação ou durante todo o período experimental (8 semanas)	Redução (em relação ao controle, na fase de iniciação)	Redução
Moreno <i>et al.</i> (7)	BC, CO ou VA administrados durante todo o período experimental (8 semanas)	Redução (em relação ao controle e à vitamina A, nas fases de iniciação e de promoção precoce)	Redução
Rizzi <i>et al.</i> (8)	BC, CO ou VA administrados após AAF + PH (5 semanas)	Redução (em relação ao controle e à vitamina A, na fase de promoção precoce)	Redução
Dagli <i>et al.</i> (9)	BC, CO ou VA administrados durante todo o período experimental (8 semanas)	Redução (em relação ao controle e à vitamina A, nas fases de iniciação e de promoção precoce)	Redução

¹RH: modelo do hepatócito resistente, que compreende a administração de dietilnitrosamina (DEN) como agente iniciante e de 2-acetilaminofluoreno (AAF) combinado com hepatectomia parcial (PH) a 70% para a seleção/promoção. ²Em relação à incidência de lesões pré-neoplásicas. ³Em relação à área ocupada pelas células ovais na região periportal de fígado de animais sacrificados ao final do experimento (cerca de 4 semanas após PH). ⁴CO: óleo de milho (controle) e VA: vitamina A.

novas células - uma permanece como *stem cell*, enquanto a outra expressa um fenótipo mais diferenciado²⁵. Nesse sentido, existem evidências consideráveis a favor da existência de células progenitoras multipotentes no fígado, que podem ser recrutadas para proliferação e subsequente diferenciação em várias linhagens hepatocelulares, após injúria severa do fígado ou exposição a carcinógenos^{5,23,26}. Acredita-se que as células ovais constituiriam, por sua vez, o primeiro estágio de diferenciação das *stem cells* hepáticas²⁰.

As células ovais compreendem uma população de células imaturas, que expressam características de fenótipos antigênicos tanto de hepatócitos quanto de células do epitélio biliar, apesar de morfologicamente lembrarem estas últimas²⁷⁻³⁰. Um achado bastante interessante refere-se ao fato de que as células ovais constituem uma população heterogênea, que, contêm linhagens celulares em estágios distintos de diferenciação¹⁰, na qual algumas células

podem funcionar como células progenitoras, com potencial para se diferenciar em hepatócitos e células epiteliais biliares^{12,14,27,31-33}, e podem agir como precursoras de carcinomas hepatocelulares e colangiocarcinomas^{11,19,22,25}, conforme esquema apresentado na Figura 1.

Modelos *in Vivo* de Diferenciação Celular Hepática

Existem três modelos experimentais, através dos quais foi possível demonstrar, em animais adultos, a diferenciação de células ovais em hepatócitos^{12,14,31}. Dois desses modelos consistem na administração de um carcinógeno químico, combinada com hepatectomia parcial a 70%, para promover a ativação, proliferação e diferenciação das denominadas células ovais. São eles: o modelo de hepatocarcinogênese induzida em camundongos pela droga alquilante dipina (1,4-bis [N,N' - di(etileno) - fosfamida] - piperazina)¹⁴, e o

modelo AAF/PH (2-acetilaminofluoreno / hepatectomia parcial)³¹. O terceiro modelo, não-carcinogênico, compreende a administração de dose hepatotóxica de D-galactosamina, em ratos¹².

Estes sistemas experimentais baseiam-se no princípio segundo o qual o processo de regeneração hepática via células ovais ocorrerá se os hepatócitos remanescentes estiverem funcionalmente comprometidos e/ou forem incapazes de responder a estímulo proliferativo. Nestas condições, células que se encontram normalmente inertes no compartimento de *stem cells*, são ativadas para produzir as células ovais descendentes, bem pouco diferenciadas ou imaturas. As células ovais proliferam extensivamente, gerando uma grande população de células que migram através do parênquima, local em que progênie de linhagens hepatocitárias se diferenciam em hepatócitos maduros, contribuindo para restaurar a massa celular hepática⁵. Por outro lado, observa-se que apenas um estímulo proliferativo, mesmo sendo potente como a hepatectomia parcial a 70%, não promove a proliferação significativa de células ovais, o que se consegue associando à cirurgia, a administração de drogas citotóxicas.

O modelo AAF/PH corresponde ao modelo RH de hepatocarcinogênese modificado^{34,35}, sem exposição ao agente iniciante (dietilnitrosamina). Compreende, portanto, a administração de AAF a ratos isogênicos da linhagem Fischer 344 (com peso aproximado de 150g), por via intragástrica, em nove doses (9mg AAF/rato) distribuídas por duas semanas consecutivas, com hepatectomia parcial a 70% (entre a primeira e segunda semanas)³¹. O efeito antimitótico do AAF sobre os hepatócitos maduros, combinado com o estímulo proliferativo provocado pela perda maciça do parênquima hepático, induz a uma ativação do compartimento de células-tronco hepáticas. Assim, células ovais aparecem inicialmente nas áreas periportais cerca de dois dias após a hepatectomia parcial, e gradualmente invadem o ácino hepático. O pico de proliferação de células ovais é observado no período de 7 a 11 dias após a cirurgia. As células ovais se diferenciam em pequenos hepatócitos, e a regeneração do parênquima se completa por volta do 16º dia após a hepatectomia^{36,37}.

Observa-se ainda, no modelo AAF/PH, a formação de uma rede de ductos jovens (neoformados) que se difundem no parênquima hepático^{29,33,38}, bem como a presença esporádica de lesões pré-neoplásicas (focos de hepatócitos fenotipicamente alterados)³².

Tatematsu *et al.*³⁹, ao utilizarem o modelo AAF/PH (originalmente descrito por esses autores), relataram um efeito antimitótico potente do AAF sobre os hepatócitos remanescentes, que persistiu até uma semana após o término da administração do AAF. Entretanto, os autores não evidenciaram a diferenciação das células ovais em hepatócitos. Posteriormente, Thorgeirsson e seu grupo de pesquisadores, do Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos EUA, demonstraram *in vivo*, através deste modelo, uma relação precursor-produto entre as células ovais e os hepatócitos³¹. Assim, relataram que a marcação por timidina tritiada (administrada ao 6º dia após a hepatectomia) foi incorporada primeiramente pelas células ovais, e que, a partir do 9º dia após a cirurgia, foi transferida para pequenos hepatócitos presentes próximos àquelas, concluindo que a radioatividade observada nos hepatócitos foi derivada das células ovais. Estes resultados foram confirmados por outro estudo, onde fora, associadas técnicas de marcação com timidina tritiada, e hibridização *in situ* com sondas (RNA) para albumina e α -feto-proteína marcadas com³⁵ S³².

Outro achado interessante, observado pela equipe de Thorgeirsson, através do uso de técnicas de imuno-histoquímica e hibridização *in situ*, refere-se ao fato de que a proliferação de células ovais (positivas para o antígeno OV-6) na região periportal, e subsequente infiltração no parênquima hepático, é acompanhada por proliferação simultânea das células de Ito (células estelares, perisinusoidais, positivas para o antígeno desmina), que inclusive são células de depósitos de vitamina A⁴⁰. Mais ainda, constataram, de forma concomitante com o processo proliferativo, que as células de Ito apresentam aumento na expressão de fatores de crescimento, tais como TGF- α e β_1 (fator de transformação do crescimento) e HGF (fator de crescimento de hepatócitos), envolvidos na regeneração hepática, sugerindo participação destes fatores na proliferação e

diferenciação das células ovais⁴⁰⁻⁴².

A diferenciação das células ovais em hepatócitos foi posteriormente investigada no modelo AAF/PH por Zhang & Thorgeirsson⁴³, através da análise da expressão de conexinas - cx (proteínas estruturais das comunicações intercelulares via junções comunicantes ou *gap junctions*), por meio da técnica *northern blot*, combinada com a análise da localização celular de transcritos (mRNA de conexinas), por hibridização *in situ*. Desse modo, os autores observaram que a proliferação das células ovais ocorre concomitantemente com o aumento na expressão da conexina 43, presente nas *gap junctions* destas células, e que a cx 43 reduz à medida que as células ovais se diferenciam em hepatócitos. Isto ocorre simultaneamente com a normalização da expressão gênica para cx 32 (proteína das *gap junctions* dos hepatócitos), no 16º dia após a hepatectomia. Neveu *et al.*⁴⁴, também utilizaram a expressão de conexinas para estudar o processo de diferenciação fenotípica das células ovais em hepatócitos, obtendo resultados consistentes com aqueles relatados por Zhang & Thorgeirsson. Nesse sentido, os autores constataram que os pequenos hepatócitos, provavelmente derivados das células ovais e que apareceram no 11º dia pós-hepatectomia, expressam ambas as conexinas 32 e 26, e que houve uma transição na expressão da conexina 43 para as conexinas 32 e 26, durante o processo de diferenciação das células ovais.

Além disso, descreve-se que durante o processo de restauração do fígado, a nova população de hepatócitos originar-se-ia tanto de células ovais, quanto de células epiteliais dos pequenos ductos neoformados^{29,33}, que por sua vez constituiriam progênies daquelas³⁸. Contudo, relata-se que a reposição do parênquima hepático no modelo AAF/PH pode ocorrer também através da proliferação dos hepatócitos remanescentes⁴⁵.

Células Ovais e Hepatocarcinogênese

O fígado contém dois tipos principais de células epiteliais diferenciadas: os hepatócitos, que estão localizados no parênquima hepático e representam cerca de 60% das células

desse órgão, e as células epiteliais biliares, localizadas nos ductos biliares. A unidade estrutural e funcional do parênquima hepático é o ácino, organizado em formato de roda, sendo o aro delimitado por um conjunto de seis tríades ou espaços portais (vênula portal, arteriola hepática e ducto biliar) e o eixo central representado pela veia central ou vênula hepática terminal. Os raios da roda são formados por placas de hepatócitos, dispostas em cordões delimitados por sinusóides fenestrados. Os ácinos são divididos em três zonas: zona 1, ou periportal, zona 2 ou mediozonal (região intermediária) e zona 3, adjacente à veia central²⁰.

Postula-se que as placas sinusoidais sejam linhagens de células hepáticas em processo de maturação, partindo-se de células progenitoras periportais (zona 1) para células maduras ou completamente diferenciadas (zona 3), com aspectos morfológicos, expressões gênicas, características fenotípicas, e potenciais proliferativo e diferenciativo, dependentes da idade ou posição ao longo da placa. Neste modelo, considera-se que os hepatócitos menos diferenciados tendem a se localizar nas proximidades da região periportal, e os hepatócitos completamente diferenciados, os quais não são, via de regra, responsivos a estímulo mitogênico, ficariam arranjados próximos ao centro do ácino hepático^{20,25}.

A reposição do parênquima hepático, após hepatectomia parcial é feita basicamente às custas da proliferação dos hepatócitos remanescentes (hiperplasia compensatória); porém quando ocorre injúria severa com perda substancial da massa celular, como no caso de exposição a hepatocarcinógenos químicos, o fígado recruta as células progenitoras sobreviventes^{5,20}. Sugere-se que as células ovais sejam resistentes a carcinógenos, que por sua vez são citotóxicos (citostático ou necrosante) para os hepatócitos diferenciados, induzindo uma resposta regenerativa crônica das células progenitoras, bem como das precursoras intermediárias dos hepatócitos maduros, responsivas ao estímulo proliferativo. Este estado proliferativo crônico favoreceria a transformação destas células imaturas, que interromperiam o processo de diferenciação em curso, tornando-se potencialmente neoplásicas^{10,20,21}. Desse modo, os

hepatócitos menos diferenciados, ou seja, localizados mais próximos à região periportal, seriam potencialmente mais carcinogênicos¹.

Segundo esta perspectiva, o câncer originar-se-ia de células imaturas transformadas, que detêm potencial proliferativo e imortalidade por bloqueio irreversível do processo de diferenciação (conforme Figura 1), em contraposição à teoria de que o câncer desenvolver-se-ia em conseqüência da “desdiferenciação” de células maduras (completamente diferenciadas). Esta visão alternativa da origem celular do câncer baseia-se no conceito de ontogenia bloqueada, proposto por Pierce & Johnson⁴⁶, a partir da observação de que células neoplásicas expressam fenótipos representando estágios da ontogenia normal. Mais recentemente, este conceito foi confirmado por Hixson *et al.*³⁰, através do uso de marcadores fenotípicos em imuno-histoquímica: as células ovais e carcinomas hepatocelulares primários expressariam fenótipos que simulam estágios do desenvolvimento normal do fígado, e que células ovais transformadas e células de carcinomas são incapazes de completar a diferenciação para hepatócitos ou células epiteliais biliares.

Durante aproximadamente três décadas, o estudo da hepatocarcinogênese química experimental concentrou-se na análise de lesões pré-neoplásicas (focos e nódulos de hepatócitos), assumindo-se que carcinomas hepatocelulares são provenientes de nódulos que persistem meses após exposição a agentes carcinogênicos.

Contudo, tem-se acumulado um corpo considerável de evidências a favor da hipótese alternativa de que o carcinoma hepatocelular e o colangiocarcinoma não se originam por “desdiferenciação” de hepatócitos maduros ou de células do epitélio biliar, respectivamente, mas por um processo anormal de diferenciação das células ovais^{1,10,19,21-23}. As evidências que fundamentam esta hipótese incluem: as células ovais apresentam expressão aumentada de oncogenes⁴⁷⁻⁴⁹; células ovais são capazes de se diferenciar em hepatócitos e em células do epitélio biliar, conforme demonstrado tanto *in vitro* quanto *in vivo*^{12,27,31,32}; células ovais apresentam fenótipos, tais como os antígenos OV-6 e OC.2, que são observados também em lesões pré-neoplásicas e neoplá-

sicas, em modelos de hepatocarcinogêneses^{10,11,40,50,51}; alguns protocolos experimentais de hepatocarcinogênese induzem à proliferação de células ovais sem proliferação aparente de hepatócitos¹⁰.

Entretanto, relatos de estudos realizados por grupos de pesquisa distintos, em modelos de animais transgênicos, indicam que hepatócitos maduros têm potencial proliferativo, e que hepatócitos não migram ao longo do ácino hepático⁵²⁻⁵⁴, em oposição à migração compensatória existente no sistema de linhagem celular, postulado para a reposição celular hepática²⁰. Além disso, relatos sugerem que tanto hepatócitos quanto células ovais podem se desenvolver para carcinoma hepatocelular ou colangiocarcinoma, bastando para tanto o acúmulo de um número suficiente de mutações genéticas (revisado em 22). Para ilustrar o quanto o tema é controverso, Anilkumar *et al.*¹⁵ constataram que focos e nódulos foram derivados de hepatócitos resistentes, e não de células ovais, que aparentemente se desenvolveram de forma independente das lesões pré-neoplásicas, no modelo do hepatócito resistente de carcinogênese experimental.

β -Caroteno e Diferenciação das Células Ovais

Em estudos de hepatocarcinogênese no modelo RH⁶⁻⁸, observamos, através de análise histopatológica (hematoxilina e eosina - HE), redução na população de células ovais remanescentes (ao final do período experimental), concomitante com um efeito inibitório sobre lesões hepáticas pré-neoplásicas, em animais tratados com β -caroteno, quando em comparação com ratos-controle ou tratados com vitamina A. (Tabela 1) Esta relação foi também constatada em outros trabalhos do nosso grupo, por meio de análises imuno-histoquímicas, utilizando-se anticorpos anticitoqueratinas (AE1/AE3) e anti-GST-P (glutathione S - transferase, em sua forma placentária)^{9,55}.

Estes achados sugerem que o β -caroteno pode favorecer a diferenciação terminal completa das células ovais, como um eventual mecanismo de ação quimiopreventiva do carotenóide sobre o processo de carcinogê-

Tabela 2. β -Caroteno e Diferenciação Celular

ESTUDO	MODELO	INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ¹	
		Carotenóides	Retinóides
Hazuka <i>et al.</i> (56)	Células B-16 (melanoma)	β -Caroteno (+)	Retinol (-)
Rock <i>et al.</i> (57)	Células MCF-10 A (tecido mamário)	β -Caroteno (+) Cantaxantina (+)	—
Gross <i>et al.</i> (58)	Células HL-60 (leucemia promielocítica)	β -Caroteno (+) Luteína (+)	Ácido retinóico (+)
Biesalski & Schäffer (59)	Células HL-60 (leucemia promielocítica)	β -Caroteno (+)	Ácido retinóico (+) Todo- <i>trans</i> -retinoil- β -D-glucoronida (+)
Nikawa <i>et al.</i> (60)	Células F-9 (carcinoma embrionário)	β -Caroteno (+) Cantaxantina (-)	Ácido retinóico todo- <i>trans</i> (+) Ácido retinóico 9- <i>cis</i> (+) Ácido 4-oxi-retinóico (+)

¹(+) ação observada; (-) ação não-observada; — substância não-testada

nese no fígado, uma vez que as células ovais podem dar origem ao câncer hepático, conforme mencionado anteriormente. (Figura 1).

De fato, existem alguns estudos que evidenciam uma ação do β -caroteno sobre a diferenciação celular, em modelos *in vitro*, conforme apresentado na Tabela 2. A maioria desses relatos sugere uma ação intrínseca do carotenóide no sentido de induzir a diferenciação celular, baseada nas seguintes constatações: ausência de ação similar por parte do retinol⁵⁶; outros carotenóides sem atividade pró-vitamina A também apresentaram esta ação^{57,58}; ausência de ácido retinóico no meio de cultura tratado com β -caroteno⁵⁹. Contudo, postula-se uma atividade do carotenóide via retinóides ativos produzidos no meio de cultura, inclusive por bioconversão química⁶⁰. Vale esclarecer que o termo retinóides inclui a vitamina A (retinol) e seus metabólitos naturais (retinal e ácido retinóico), bem como seus derivados sintéticos⁶¹. O β -caroteno, por sua vez, é um carotenóide que pode gerar retinóides, através de conversão metabólica via clivagem central e/ou excêntrica da molécula⁶².

Em trabalho recente⁶³, no modelo AAF/PH adaptado para ratos Wistar, observa-se que o β -caroteno retardou o processo de proliferação das células ovais e a expressão

gênica para cx 43, de forma similar à vitamina A. Por outro lado, o carotenóide apresentou uma ação intrínseca (de forma diversa da vitamina A) sobre a população de células ovais remanescentes, consistente com a diferenciação terminal completa destas células, ou seja, reduziu o número de células não-parenquimatosas presentes na região periportal ao final do experimento (16° dia após a hepatectomia parcial).

Sendo assim, a atividade quimiopreventiva do β -caroteno, observada em modelos de hepatocarcinogênese química experimental, pode estar relacionada com uma ação intrínseca do carotenóide na indução da diferenciação das células ovais. Todavia, a eventual capacidade do β -caroteno (e de outros carotenóides) em induzir a diferenciação celular, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos, bem como suas possíveis implicações na quimioprevenção do câncer necessitam de maior comprovação biológica.

Referências Bibliográficas

- SCOTT, R.E. Differentiation, differentiation / gene therapy and cancer. *Pharmacol Ther* 1997; 73: 51-65.
- MARKERT, C. Neoplasia: a disease of cell

- differentiation. *Cancer Res* 1968; 28:1908-1914.
3. WILLE JR., J.J. ; SCOTT, R.E. Suppression of tumorigenicity by the cell-cycle-dependent control of cellular differentiation and proliferation. *Int J Cancer* 1986; 37:875-881.
 4. TROSKO, J.E.; CHANG, C.C.; MADHUKAR, B.V.; KLAUNIG, J.E. Chemical, oncogene and growth factor inhibition of gap junctional intercellular communication: an integrative hypothesis of carcinogenesis. *Pathobiology* 1990; 58:265-278.
 5. THORGEIRSSON, S.S. Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J* 1996; 10:1249-1256.
 6. MORENO, F.S.; RIZZI, M.B.S.L.; DAGLI, M.L.Z.; PENTEADO, M.C.V. Inhibitory effects of β -carotene on preneoplastic lesions induced in wistar rats by the resistant hepatocyte model. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1817-1822.
 7. MORENO, F.S.; WU, T.S.; PENTEADO, M.C.V. et al. A comparison of β -carotene and vitamin A effects on a hepatocarcinogenesis model. *Int J Vitam Nutr Res* 1995; 65:87-94.
 8. RIZZI, M.B.S.L.; DAGLI, M.L.Z.; JORDÃO JR., A.A.; PENTEADO, M.V.C.; MORENO, F.S. β -carotene inhibits persistent and stimulates remodeling gGT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. *Int J Vitam Nutr Res* 1997;67:415-422.
 9. DAGLI, M. L. Z.; GUERRA, J.L.; SINHORINI, I.L. et al. Beta-carotene reduces the ductular (oval) cell reaction in the liver of Wistar rats submitted to the resistant hepatocyte model of carcinogenesis. *Pathology* 1998; 30:259-266.
 10. HIXSON, D.G.; FARIS, R.A.; THOMPSON, N.L. An antigenic portrait of the liver during carcinogenesis. *Pathobiology* 1990; 58:65-77.
 11. FARIS, R.A.; MONFILS, B.A.; DUNSFORD, H.A.; HIXSON, D.C. Antigenic relationship between oval cells and a subpopulation of hepatic foci, nodules, and carcinomas induced by the "Resistant Hepatocyte" model system. *Cancer Res* 1991;51: 1308-1317.
 12. LEMIRE, J.M.; SHIOJIRI, N.; FAUSTO, N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* 1991; 139: 535-552.
 13. HSIA, C.C.; EVARTS, R.P.; NAKATSUKASA, H.; MARSDEN, E.R.; THORGEIRSSON, S.S. Occurrence of oval-type cells in hepatitis B virus-associated human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1992; 16:1327-1333.
 14. FACTOR, V.M.; RADAIEVA, S.A.; THORGEIRSSON, S.S. Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am J Pathol* 1994; 145:409-422.
 15. ANILKUMAR, T.V.; GOLDING, M.; EDWARDS, R.J.; LALANI, E.N.; SAFFAR, C.E.; ALISON, M.R. The resistant hepatocyte model of carcinogenesis in the rat: the apparent independent development of oval cell proliferation and early nodules. *Carcinogenesis* 1995; 16: 845-853.
 16. OPIE, E.L. The pathogenesis of tumors in the liver produced by butter yellow. *J Exp Med* 80:231-246.
 17. FARBER, E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethyl-aminobenzene. *Cancer Res* 1956; 16:142-148.
 18. SELL, S.; LEFFERT, H.L. An evaluation of cellular lineages in the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1982; 2:77-86.
 19. SELL, S.; DUNSFORD, H.A. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 1989; 134:1347-1363.
 20. SIGAL, S.H.; BRILL, S.; FIORINO, A.S.; REID, L.M. The liver as a stem cell and lineage system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1992; 26:G139-G148.
 21. SELL, S.; PIERCE, G.B. Maturation arrest of stem cell differentiation in a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest* 1994; 70: 6-22.
 22. PONDER, K.P. Analysis of liver development, regeneration, and carcinogenesis by genetic marking studies. *FASEB J* 1996; 10:673-684.
 23. SELL, S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res* 1990; 50:3811-3815.
 24. LEMIRE, J.M.; FAUSTO, N. Multiple a-fetoprotein RNAs in adult rat liver: cell type-specific expression and differential regulation. *Cancer Res* 1991; 51:4656-4664.
 25. SELL, S. The role of determined stem-cells in the cellular lineage of hepatocellular carcinoma. *Int J Dev Biol* 1993; 37:189-201.
 26. TRAVIS, J. The search for liver stem cells picks up. *Science* 1993; 259:1829.
 27. GERMAIN, L.; NOËL, M.; GOURDEAU,

- H.; MARCEAU, N. Promotion of growth and differentiation of rat ductular oval cells in primary culture. *Cancer Res* 1988; 48:368-378.
28. RADAIEVA, S.; STEINBERG, P. Phenotype and differentiation patterns of the oval cell lines OC/CDE 6 and OC/CDE 22 derived from the livers of carcinogen-treated rats. *Cancer Res* 1995; 55:1028-1038.
29. TEE, L.B.G.; KIRILAK, Y.; HUANG, W.H.; SMITH, P.G.J.; MORGAN, R.H.; YEOH, G.C.T. Dual phenotypic expression of hepatocytes and bile ductular markers in developing and preneoplastic rat liver. *Carcinogenesis* 1996; 17:251-259.
30. HIXSON, D.C.; CHAPMAN, L.; McBRIDE, A.; FARIS, R.; YANG, L. Antigenic phenotypes common to rat oval cells, primary hepatocellular carcinomas and developing bile ducts. *Carcinogenesis* 1997; 18:1169-1175.
31. EVARTS, R.P.; NAGY, P.; MARSDEN, E.R.; THORGEIRSSON, S.S. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* 1987; 8:1737-1740.
32. EVARTS, R.P.; NAGY, P.; NAKATSUKASA, H.; MARSDEN, E.R.; THORGEIRSSON, S.S. *In vivo* differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res*, 49: 1541-1547, 1989.
33. GOLDING, M.; SARRAF, C.E.; LALANI, E.N. et al. Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene - treated regenerating rat liver. *Hepatology* 1995; 22:1243-1253.
34. SOLT, D.T.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 1976; 263:701-703.
35. 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* 1987; 40:643-645.
36. THORGEIRSSON, S.S.; EVARTS, R.P.; BISGAARD, H.C.; FUJIO, K.; HU, Z. Hepatic stem cell compartment: activation and lineage commitment. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 204:253-260.
37. NAGY, P.; BISGAARD, H. C.; THORGEIRSSON, S. S. Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation. *J Cell Biol* 1994; 126:223-233.
38. TEE, L. B. G.; KIRILAK, Y.; HUANG, W. H.; MORGAN, R. H.; YEOH, G. C. T. Differentiation of oval cells into duct-like cells in preneoplastic liver of rats placed on a choline-deficient diet supplemented with ethionine. *Carcinogenesis* 1994; 15:2747-2756.
39. TATEMATSU, M.; HO, R.H.; KAKU, T.; EKEM, J.K.; FARBER, E. Studies on proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy. *Am J Pathol* 1984; 114:418-430.
40. EVARTS, R.P.; NAKATSUKASA, H.; MARSDEN, E.R.; HSIA, C.C.; DUNSFORD, H.A.; THORGEIRSSON, S.S. Cellular and molecular changes in the early stages of chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Cancer Res* 1990; 50:3439-3444.
41. EVARTS, R.P.; HU, Z.; FUJIO, K.; MARSDEN, E.R.; THORGEIRSSON, S.S. Activation of hepatic stem cell compartment in the rat: role of transforming growth factor α , hepatocyte growth factor, and acidic fibroblast growth factor in early proliferation. *Cell Growth & Differ* 1993; 4:555-561.
42. HU, Z.; EVARTS, R.P.; FUJIO, K.; MARSDEN, E.R.; THORGEIRSSON, S.S. Expression of hepatocyte growth factor and *c-met* genes during hepatic differentiation and liver development in the rat. *Am J Pathol* 1993; 142:1823-1830.
43. ZHANG, M.; THORGEIRSSON, S.S. Modulation of connexins during differentiation of oval cells into hepatocytes. *Exp Cell Res* 1994; 213:37-42.
44. NEVEU, M.J.; HULLY, J.R.; BABCOCK, K.L.; VAUGHAN, J.; HERTZBERG, E.L.; NICHOLSON, B.J.; PAUL, D.L.; PITOT, H.C. Proliferation-associated differences in the spatial and temporal expression of gap junction genes in rat liver. *Hepatology* 1995; 22: 202-212.
45. GERLYNG, P.; GROTMOL, T.; STOKKE, T.; ERIKSTEIN, B.; SEGLEN, P.O. Flow cytometric investigation of a possible precursor-product relationship between oval cells and parenchymal cells in the rat liver. *Carcinogenesis* 1994; 15:53-59.
46. PIERCE, G.B.; JOHNSON, L.D. Differentiation and cancer. *In Vitro* 1971; 7:140-145.
47. NAGY, P.; EVARTS, R.P.; MARSDEN, E.; ROACH, J.; THORGEIRSSON, S.S. Cellular distribution of *c-myc* transcripts during

- chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48:5522-5527.
48. BRAUN, L.; MIKUMO, R.; FAUSTO, N. Production of hepatocellular carcinoma by oval cells: cell cycle expression of *c-myc* and p53 at different stages of oval cell transformation. *Cancer Res* 1989; 49:1554-1561.
49. IMAI, T.; MASUI, T.; NAKANISHI, H. et al. Expression of hepatocyte growth factor and *c-met* mRNAs during rat chemically induced hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1996; 17:19-24.
50. GOYETTE, M.; FARIS, R.; BRAUN, L.; HIXSON, D.; FAUSTO, N. Expression of hepatocyte and oval cell antigens in hepatocellular carcinomas produced by oncogene-transfected liver epithelial cells. *Cancer Res* 1990; 50:4809-4817.
51. STEINBERG, P.; STEINBRECHER, R.; RADAIEVA, S. et al. Oval cell lines OC/CDE 6 and OC/CDE 22 give rise to cholangio-cellular and undifferentiated carcinomas after transformation. *Lab Invest* 1994; 71:700-709.
52. RHIM, J.A.; SANDGREN, E.P.; DEGEN, J.L.; PALMITER, R.D.; BRINSTER, R.L. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transformation. *Science* 1994; 263: 1149-1152.
53. BRALET, M.P.; BRANCHEREAU, S.; BRECHOT, C.; FERRY, N. Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. *Am J Pathol* 1994; 144:896-905.
54. KENNEDY, S.; RETTINGER, S.; FLYE, M.W.; PONDER, K.P. Experiments in transgenic mice show that hepatocytes are the source for postnatal liver growth and do not stream. *Hepatology* 1995; 22:160-168.
55. FIORIO, W.A.B. Aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos de fígados de ratos tratados com β -caroteno e vitamina A em estágios precoces de carcinogênese, no modelo do hepatócito resistente. 1998. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
56. HAZUKA, M.B.; EDWARDS-PRASAD, J.; NEWMAN, F.; KINZIE, J.J.; PRASAD, K.N. β -Carotene induces morphological differentiation and decreases adenylate cyclase activity in melanoma cells in culture. *J Am Coll Nutr* 1990; 9:143-149.
57. ROCK, C.L.; KUSLUSKI, R.A.; GALVEZ, M.M.; ETHIER, S.P. Carotenoids induce morphological changes in human mammary epithelial cell cultures. *Nutr Cancer* 1995; 23:319-333.
58. GROSS, M.D.; BISHOP, T.D.; BELCHER, J.D.; JACOBS JR., D.R. Induction of HL-60 cell differentiation by carotenoids. *Nutr Cancer* 1997; 27:169-173.
59. BIESALSKI, H.K.; SCHÄFFER, M. Comparative assessment of the activity of beta-carotene, retinoyl-beta-D-glucuronide and retinoic acid on growth and differentiation of a human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Int J Vitam Nutr Res* 1997; 67:357-363.
60. NIKAWA, T.; SCHULZ, W.A.; VAN DEN BRINK, C.E.; HANUSCH, M.; VAN DER SAAG, P.; STAHL, W.; SIES, H. Efficacy of all-*trans*- β -carotene, canthaxanthin, and all-*trans*-9-*cis*, and 4-oxoretinoic acids in inducing differentiation of an F9 embryonal carcinoma RARb-*lacZ* reporter cell line. *Arch Biochem Biophys* 1995; 316:665-672.
61. SPORN, M.B.; ROBERTS, A.B. What is a retinoid? *Ciba Found Symp* 1985; 113:1-5.
62. SILVEIRA, E.R.; MORENO, F.S. Natural retinoids and β -carotene: from food to their actions on gene expression. *J Nutr Biochem* 1998; 9:446-456.
63. NAVES, M.M.V. Beta-caroteno e vitamina A modulam a proliferação de células ovas e a expressão gênica para conexina 43 em modelo in vivo de diferenciação celular hepática. 1999. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.