

ELIANE MORETO SILVA OLIVEIRA

CONSUMO DE CAFÉ E RESTRIÇÃO  
ALIMENTAR NA MODULAÇÃO DA  
HEPATOCARCINOGENESE QUÍMICA

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2012

ELIANE MORETO SILVA OLIVEIRA

CONSUMO DE CAFÉ E RESTRIÇÃO  
ALIMENTAR NA MODULAÇÃO DA  
HEPATOCARCINOGENESE QUÍMICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Tasso Moraes e Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2012

O48c Oliveira, Eliane Moreto Silva  
Consumo de café e restrição alimentar na modulação da  
hepatocarcinogênese química / Eliane Moreto Silva Oliveira. – 2012.  
101 f. : il.

Orientador: Dr. Tasso Moraes e Santos.  
Coorientador: Dr. Anilton César Vasconcelos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais,  
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência  
de Alimentos.

1. Café - Restrição alimentar - Teses. 2. Hepatocarcinogênese  
química - Teses. 3. Modelo hepatócito resistente - Teses. 4.  
Peroxidação lipídica - Teses. 5. Sistema antioxidante endógeno -  
Teses. 6. Sistema de biotransformação hepático - Teses. 7.  
Proliferação celular - Teses. 8. Apoptose - Teses. I. Santos, Tasso  
Moraes e. II. Vasconcelos, Anilton César. III Universidade Federal  
de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:663.93



**“Ao transferir bens materiais, o doador perde a sua posse. Há, porém, alguns atributos intrínsecos que não podem ser transferidos de um indivíduo para o outro, como a beleza e a coragem. O conhecimento, por outro lado, é algo tão importante que os deuses decidiram que o doador pode retê-lo mesmo que o tenha transmitido.”**

**Pitágoras de Samos, cerca de 520 a.C.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, Bondoso Pai, pelo dom da vida;

Ao Prof. Dr. Tasso Moraes e Santos, exemplo de ser humano e pesquisador, pelas oportunidades oferecidas, pelos ensinamentos e orientação;

Ao Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos pela atenção e co-orientação, fundamentais para a realização deste estudo;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG pela contribuição em minha formação científica;

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Farmácia da UFMG, Alessandra Alexandrino Diniz, Maria das Graças Vilela Torquato e Renata Viana Abreu, pela colaboração, carinho, amizade e muitos bons momentos compartilhados;

À amiga Cecília Muller Bandeira do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da UFMG pela disponibilidade e colaboração constantes;

Às amigas do Laboratório de Apoptose do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Núbia Braga Pereira e Soraia Silvéria Silva, pela disponibilidade e ajuda nas técnicas histológicas;

À veterinária Maria Adelaide Fernandes e ao José Batista Viturino pela disponibilidade e auxílio na manutenção dos animais;

Aos órgãos institucionais financiadores CAPES, CNPq, FAPEMIG e PRPQ-UFMG;

Agradeço ainda àqueles que sempre me acompanham ao longo do caminho, lado a lado, acreditando, apoiando e incentivando. A vocês, meu respeito, carinho e eterna gratidão.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	9
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	10
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	11
<b>RESUMO</b> .....	13
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
2.1 Sistema de biotransformação hepático .....	17
2.2 Radicais livres e sistemas de defesa antioxidante .....	21
2.3 Estresse oxidativo e peroxidação lipídica.....	26
2.4 Ciclo celular e apoptose .....	28
2.5 Carcinogênese química.....	32
2.6 Hepatocarcinogênese experimental e modelo hepatócito resistente .....	35
2.7 Café, contituíntes e quimioproteção .....	38
2.8 Restrição calórica e modulação da carcinogênese .....	41
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
3.1 Equipamentos .....	44
3.2 Reagentes químicos.....	44
3.3 Caracterização e extração do café.....	45
3.4 Preparo das dietas .....	45
3.5 Desenho experimental.....	46
3.6 Hepatectomia parcial e sham hepatectomia.....	49
3.7 Regeneração hepática .....	49
3.8 Coleta e preparo das amostras .....	50
3.9 Análise morfológica e morfométrica .....	51
3.10 Determinação de proteína.....	53
3.11 Peroxidação lipídica .....	54
3.12 Determinação de glutathiona reduzida.....	54
3.13 Atividade da uridina difosfato glicuronosiltransferase.....	55
3.14 Atividade da glutathiona s-transferase .....	56
3.15 Atividade da glutathiona redutase .....	57
3.16 Análise estatística dos dados .....	57
<b>4 RESULTADOS</b> .....	59
4.1 Consumo de ração e peso corporal .....	59
4.2 Peso do fígado e regeneração hepática.....	62
4.3 Análise morfológica e morfométrica .....	64

4.3.1 Análise macroscópica.....	64
4.3.2 Análise microscópica.....	65
4.3.3 Análise morfométrica.....	66
4.4 Conteúdo de proteína.....	69
4.5 Peroxidação lipídica .....	70
4.6 Conteúdo de glutatona reduzida.....	71
4.7 Atividade da uridina difosfato glicuronosiltransferase.....	72
4.8 Atividade da glutatona S-transferase.....	73
4.9 Atividade da glutatona redutase .....	74
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional centesimal e valor calórico das dietas controle e café .....	46
Tabela 2 – Peso do fígado e percentual de regeneração hepática .....	63
Tabela 3 – Morfometria de lesões pre-neoplásicas em cortes histológicos hepáticos dos grupos de animais submetidos ao modelo hepatócito resistente .....	67
Tabela 4 – Índice de apoptose hepática dos grupos de animais submetidos ao modelo hepatócito resistente.....	68
Tabela 5 – Índice de proliferação celular hepático dos grupos de animais submetidos ao modelo hepatócito resistente.....	69

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Apresentação esquemática do desenho experimental.....	48
Figura 2 – Apresentação esquemática do protocolo de indução da hepatocarcinogênese .....	48
Figura 3 – Consumo de ração semanal da 4 <sup>a</sup> a 6 <sup>a</sup> semana de vida .....	59
Figura 4 – Consumo de ração semanal da 7 <sup>a</sup> a 12 <sup>a</sup> semana de vida.....	60
Figura 5 – Peso corporal do 21 <sup>o</sup> ao 35 <sup>o</sup> dia de vida .....	61
Figura 6 – Peso corporal do 42 <sup>o</sup> ao 84 <sup>o</sup> dia de vida .....	62
Figura 7 – Fotografia de fígado de rato da raça Wistar submetido ao modelo hepatócito resistente. ....	64
Figura 8 – Fotomicrografia de corte histológico de fígado corado em hematoxilina e eosina de animal submetido ao modelo hepatócito resistente .....	65
Figura 9 – Fotomicrografia de corte histológico de fígado corado por Shorr de animal submetido ao modelo hepatócito resistente .....	66
Figura 10 – Fotomicrografia de corte histológico de fígado corado por Shorr mostrando hepatócitos em apoptose .....	67
Figura 11 – Fotomicrografia de corte histológico de fígado submetido à reação imunohistoquímica para PCNA mostrando hepatócitos em proliferação.....	68
Figura 12 – Conteúdo hepático de proteína .....	70
Figura 13 – Conteúdo hepático de TBARS .....	71
Figura 14 – Conteúdo hepático de glutathiona reduzida .....	72
Figura 15 – Atividade hepática da uridina difosfato glicuronosiltransferase .....	73
Figura 16 – Atividade hepática da glutathiona S-transferase. ....	74
Figura 17 – Atividade da hepática da glutathiona redutase.....	75

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2-AAF	2-Acetilaminofluoreno
CDK	Quinase dependente de ciclina
CDNB	1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
DAB	Diaminobenzidina
DEN	Dietilnitrosamina
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
GR	Glutaciona redutase
G1	<i>Gap</i> 1 (intervalo 1)
G2	<i>Gap</i> 2 (intervalo 2)
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Dissulfeto da glutaciona/glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
HE	Hematoxilina e eosina
HP	Hepatectomia parcial
HR	Hepatócito resistente
LPN	Lesões pré-neoplásicas
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
P450	Citocromo P450
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
SPM	Sobrenadante pós-mitocondrial
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
UDP	Uridina difosfato
UDPGT	Uridina difosfato glicuronosiltransferase
CO SH	Grupo de animais alimentados com dieta controle e submetidos à <i>sham</i> hepatectomia

CO AL HP	Grupo de animais alimentados <i>ad libitum</i> com dieta controle e submetidos à hepatectomia parcial
CO RA HP	Grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial
CO AL CA	Grupo de animais alimentados <i>ad libitum</i> com dieta controle e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese
CO RA CA	Grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese
Café AL HP	Grupo de animais alimentados <i>ad libitum</i> com dieta adicionada de café e submetidos à hepatectomia parcial
Café RA HP	Grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial
Café AL CA	Grupo de animais alimentados <i>ad libitum</i> com dieta adicionada de café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese
Café RA CA	Grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do café e da restrição alimentar na modulação da hepatocarcinogênese química em ratos submetidos ao modelo hepatócito resistente (HR). Ratos Wistar machos foram alimentados com ração suplementada com extrato de café 8%, submetidos à restrição alimentar de 30% e ao modelo HR. Em cortes histológicos hepáticos foram analisados o número e o tamanho de lesões pré-neoplásicas (LPN), a apoptose e a proliferação de hepatócitos constituintes dessas lesões. Bioquimicamente foram analisadas as atividades das enzimas uridina difosfato glicuronosiltransferase (UDPGT), glutathione S-transferase (GST) e glutathione redutase (GR), a peroxidação lipídica e o conteúdo de glutathione reduzida (GSH). Animais alimentados *ad libitum* com dieta café apresentaram redução de 71,7% e de 77,3% no número e tamanho das LPN, respectivamente. Nos animais submetidos à restrição alimentar a adição de café à dieta reduziu em 85,5% a área ocupada pelas LPN. A restrição alimentar não alterou o número ou o tamanho das LPN. O índice de apoptose não diferiu entre os grupos de animais. A proliferação celular foi diminuída em 42,1% nos animais que receberam *ad libitum* dieta café. A peroxidação lipídica e a atividade da GST não foram alteradas por efeito da ingestão de café ou pela restrição alimentar. Aumento no conteúdo de GSH e na atividade da GR por efeito da ingestão de café foi verificado entre os animais submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial (HP). A restrição alimentar diminuiu o conteúdo de GSH e a atividade da GR nos animais que receberam dieta controle e nos que receberam dieta café e foram submetidos ao modelo HR. A atividade da UDPGT foi diminuída pela restrição alimentar nos animais que receberam dieta café e foram submetidos à HP. Utilizando o modelo HR, não foi possível verificar alterações na peroxidação lipídica, no conteúdo de GSH e na atividade da enzima antioxidante GR e das enzimas de desintoxicação hepática UDPGT e GST como possível mecanismo de quimioproteção do café ou da restrição alimentar sobre a hepatocarcinogênese.

Palavras-chave: Café; Restrição alimentar; Hepatocarcinogênese química; Modelo Hepatócito Resistente; Peroxidação lipídica; Sistema antioxidante endógeno; Sistema de biotransformação hepático; Proliferação celular; Apoptose.

# 1 INTRODUÇÃO

As neoplasias são lesões constituídas pela proliferação celular anormal, descontrolada e autônoma, geralmente com perda ou redução da diferenciação celular, em consequência de alterações nos genes que regulam o crescimento e a diferenciação (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 2009).

As neoplasias são divididas em benignas e malignas. As benignas podem evoluir durante muito tempo, geralmente não são letais nem causam sérios transtornos para o portador. Por outro lado, as neoplasias malignas têm crescimento rápido e provocam perturbações homeostáticas graves que acabam levando o indivíduo à morte (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 2009).

Câncer é o termo usado para designar as neoplasias malignas (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 2009). O risco de câncer numa determinada população depende diretamente das características biológicas e comportamentais dos indivíduos que a compõem, bem como das condições sociais, ambientais, políticas e econômicas que os rodeiam (BRASIL, 2006).

As incidências regionais do câncer estão diretamente relacionadas aos hábitos de vida, especialmente à alimentação (WCRF/AICR, 2007), estimando-se que mais de dois terços dos cânceres em humanos possam ser prevenidos por modificação no estilo de vida (SURH, 2003).

A elevada incidência e as altas taxas de mortalidade fazem do câncer um importante problema de saúde pública e esforços devem ser mobilizados para sua prevenção e cura. A prevenção primária do câncer, com ênfase nos fatores associados ao estilo de vida e no combate a agentes cancerígenos ambientais e ocupacionais, pode trazer bons resultados na redução da incidência desta doença (BRASIL, 2006).

Quimioprevenção é uma estratégia ativa de prevenção do câncer para inibir, atrasar ou reverter a carcinogênese, usando agentes químicos de ocorrência natural ou sintéticos (KWON *et al.*, 2007). A quimioproteção contra o câncer pode resultar da ação de uma ou mais substâncias químicas que possam bloquear o início do processo neoplásico, deter ou reverter a progressão das células iniciadas para fenótipos malignos (CHEN & KONG, 2004). Compostos quimiopreventivos seriam

também aqueles capazes de interromper ou, ao menos, retardar o desenvolvimento e progressão das células pré-cancerosas para malignas (SURH, 2003).

Muitos constituintes da dieta estão associados à quimioproteção contra diferentes tipos de câncer em órgãos como mama, próstata, pulmão, cólon, estômago, fígado e rim. Os mecanismos descritos para estes constituintes envolvem: prevenção de danos oxidativos ao DNA, promoção de reparos no DNA, indução de apoptose e da resposta imunológica, modulação do sistema de biotransformação de xenobióticos, redução da produção do fator de crescimento, entre outros (FERRARI & TORRES, 2003; HEBER, 2004).

Constituintes do café como cafeína, ácidos clorogênicos, taninos e diterpenos exercem efeitos biológicos num largo espectro de sistemas. Entre os efeitos biológicos encontram-se ações antioxidantes (DEVASAGAYAM *et al.*, 1996), antimutagênicas (NEPKA *et al.*, 1999) e anticarcinogênicas (CAVIN *et al.*, 2002). Quanto à bebida, o consumo está inversamente associado com o risco de câncer em diferentes órgãos (TAVANI *et al.*, 2003; GELATTI *et al.*, 2005; OHFUJI *et al.*, 2006). Além disso, experimentalmente, foi demonstrado que o café exerce ação moduladora sobre a carcinogênese hepática induzida em ratos (TANAKA *et al.*, 1990; SILVA-OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A restrição calórica é considerada importante fator de proteção contra o risco de câncer associado à dieta. A importância da ingestão calórica na carcinogênese é suportada por experimentos animais, nos quais a restrição calórica sozinha reduz a incidência de câncer no fígado e em outros órgãos (LONGO & FONTANA, 2010). O melhor entendimento deste fenômeno e de seus mecanismos de supressão do tumor desperta grande interesse, tendo em vista ser esta uma possível estratégia de prevenção para o câncer humano.

Embora a restrição alimentar e o café se mostrem como efetivos moduladores da carcinogênese, os mecanismos pelos quais eles exercem ação moduladora são desconhecidos ou não completamente elucidados.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do café e da restrição alimentar na modulação da hepatocarcinogênese química em ratos submetidos ao modelo hepatócito resistente. Especificamente, esperou-se demonstrar efeito modulador da restrição alimentar sobre a hepatocarcinogênese em

ratos submetidos ao modelo hepatócito resistente, de maneira semelhante ao demonstrado para o café em estudo anterior realizado por nosso grupo.

Além disso, esperou-se verificar alterações benéficas sobre enzimas de biotransformação hepática, sobre o sistema antioxidante endógeno e sobre o crescimento celular que explicassem o efeito modulador do café e da restrição alimentar sobre a hepatocarcinogênese induzida em ratos.

Para isso, foram avaliados os efeitos do consumo diário de café e da restrição alimentar nos seguintes parâmetros: crescimento corporal, regeneração hepática pós-hepatectomia parcial, número e o tamanho de lesões pré-neoplásicas hepáticas, proliferação e apoptose dos hepatócitos constituintes dessas lesões, peroxidação lipídica, atividade do sistema antioxidante endógeno, representado pela glutatona reduzida e glutatona redutase, e atividade das conjugases do metabolismo de xenobióticos: glutatona S-transferase e uridina difosfato glicuronosiltransferase.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 SISTEMA DE BIOTRANSFORMAÇÃO HEPÁTICO**

O fígado é a maior glândula do corpo humano e o principal órgão envolvido na biotransformação e eliminação de compostos química e estruturalmente diversos, tanto endógenos quanto exógenos, aos quais o organismo é frequentemente exposto (LIDDLE & STEDMAN, 2007). Estes últimos são chamados de xenobióticos e incluem compostos como fármacos, poluentes ambientais e outros tóxicos (PARKINSON, 2008).

Durante o processo de biotransformação, enzimas alteram propriedades físico-químicas dos compostos orgânicos, transformando-os em moléculas mais hidrossolúveis e, portanto, mais facilmente excretáveis (PARKINSON, 2008). Nas células, as enzimas de biotransformação consistem de múltiplas formas ou superfamílias (GONZALEZ, 2005) e se localizam principalmente nas membranas do retículo endoplasmático ou na porção solúvel do citoplasma (WILKINSON, 2006), sendo menos frequente na mitocôndria ou nos lisossomos (PARKINSON, 2008). Após a homogeneização e centrifugação diferencial do homogeneizado, o retículo endoplasmático se rompe e os fragmentos da membrana formam microvesículas chamadas microssomos. Dessa forma, as enzimas metabolizadoras de xenobióticos presentes no retículo endoplasmático geralmente são classificadas como enzimas microssomais (WILKINSON, 2006).

A biotransformação de xenobióticos pode ser classificada em reações de Fase I e de Fase II. Na Fase I, grupos polares são expostos ou introduzidos na molécula do xenobiótico em reações que envolvem hidrólise, redução e oxidação (HODGSON & ROSE, 2007; PARKINSON, 2008). A oxidação é a reação mais importante no metabolismo da Fase I e é catalisada por um sistema de enzimas geralmente conhecido como monoxigenases de função mista (LIDDLE & STEDMAN, 2007).

As monoxigenases consistem de um sistema de multienzimas que geralmente compreende a citocromo P450 (P450), uma hemoproteína de membrana, e a P450 redutase, uma flavoproteína de membrana (DAVYDOV, 2001).

Nas reações de monoxigenação, a P450 funciona como um terminal oxidase em uma cadeia de transferência de elétrons (WILKINSON, 2006). Nas monoxigenases microssomais, a P450 e a P450 redutase, acoplados à superfície citoplasmática do retículo endoplasmático liso, interagem por difusão lateral formando um complexo dinâmico. Neste complexo, dois elétrons são transferidos da forma reduzida do nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para a P450 pela P450 redutase. A entrada de elétrons para a P450 é necessária para ativar o oxigênio molecular e introduzir um átomo de oxigênio na molécula do substrato (DAVYDOV, 2001).

O ferro presente na P450 se encontra normalmente no estado férrico ( $Fe^{3+}$ ). Quando se liga ao substrato, a P450 na forma férrica aceita o primeiro elétron da P450 redutase, sendo reduzida a um intermediário ferroso. Na sua forma ferrosa ( $Fe^{2+}$ ), a citocromo pode se ligar a compostos como oxigênio molecular ou monóxido de carbono. Quando é o oxigênio molecular, resulta na formação de oxicompostos, que serão reduzidos a peroxicompostos. A entrada de prótons neste intermediário pode resultar na quebra heterolítica da ligação O-O, produzindo água e um complexo, que insere um átomo de oxigênio ativado ligado ao heme dentro da molécula do substrato (GUENGERICH, 1991; DAVYDOV, 2001).

Além da oxidação, as enzimas da P450 estão envolvidas em várias reações metabólicas, incluindo hidroxilação alifática e aromática, O-, S- e N-dealquilação, desalogenação redutora e oxidativa, N-hidroxilação, demetilação e desaminação (LIDDLE & STEDMAN, 2007). Dessa forma, as monoxigenases são responsáveis pela Fase I do metabolismo da grande maioria dos xenobióticos, bem como pela oxidação de alguns substratos endógenos (WILKINSON, 2006; HODGSON & ROSE, 2007).

Nas reações da Fase II, os compostos são combinados com metabólitos endógenos altamente polares e facilmente excretáveis. As reações de biotransformação da Fase II incluem glicuronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com glutatona e com aminoácidos e são catalisadas por

enzimas denominadas em conjunto de transferases. Os cofatores destas reações reagem com grupos funcionais presentes no xenobiótico ou que foram expostos ou introduzidos durante a Fase I da biotransformação, gerando metabólitos altamente polares e, geralmente, de fácil eliminação pela via renal ou biliar (WILKINSON, 2006; HODGSON & ROSE, 2007; PARKINSON, 2008).

A glicuronidação é catalisada pelas uridina difosfato glicuronosiltransferases (UDPGTs), que compreendem uma superfamília de enzimas localizadas na membrana celular. Estas enzimas são encontradas em diversos organismos vivos e catalisam a ligação do ácido glicurônico proveniente do ácido glicurônico difosfato uridina (UDP-ácido glicurônico) com grupos funcionais, tais como hidroxila, carboxila, amino, sulfidril de substratos específicos, endógeno ou exógeno. Dessa forma, substratos de glicuronidação incluem álcoois alifáticos e fenóis, ácidos carboxílicos, aminas aromáticas e alifáticas e grupos sulfidrilas livres (TUKEY & STRASSBURG, 2000; GUILLEMETTE, 2003).

A reação de glicuronidação confere polaridade a compostos endógenos e a xenobióticos. O grupo carboxila proveniente do ácido glicurônico, que é ionizado em pH fisiológico, aumenta a solubilidade do glicuronídeo em água. O glicuronídeo é reconhecido pelos sistemas orgânicos de transporte de ânion renal e biliar, o que possibilita sua excreção pela urina e bile (TUKEY & STRASSBURG, 2000; GUILLEMETTE, 2003; PARKINSON, 2008). Comparado a outras conjugases, as UDPGTs têm o mais significativo efeito na desintoxicação e promoção da excreção de compostos via urina e bile (GUILLEMETTE, 2003)

As UDPGTs são expressas em altos níveis no fígado, porém numerosos órgãos contribuem de forma significativa na capacidade de glicuronidação do organismo. Similar a outras enzimas metabolizadoras, as UDPGTs são localizadas na superfície epitelial da mucosa nasal, do intestino, da pele, do pulmão e nos leucócitos. As UDPGTs são também expressas em vários órgãos, incluindo cérebro, próstata, útero, mama, placenta e rim (TUKEY & STRASSBURG, 2000; GUILLEMETTE, 2003).

Embora a glicuronidação seja responsável pela biotransformação de aproximadamente 35% dos xenobióticos metabolizados pela Fase II (GUILLEMETTE, 2003), a conjugação com a glutatona representa importante via de

desintoxicação de xenobióticos e compostos eletrofílicos (COMMANDEUR *et al.*, 1995).

A conjugação com a glutatona é catalisada pelas glutatona S-transferases (GSTs), uma família de enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutatona a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico (HUBER *et al.*, 2008).

As GSTs geralmente se encontram no meio biológico como homo ou heterodímeros, apresentando dois sítios ativos por dímero cujas atividades são independentes um do outro. Cada sítio ativo consiste no mínimo de duas regiões de ligação, uma para a glutatona, muito específica para este tripeptídeo, e outra com menor especificidade para os eletrófilos. Os substratos (eletrófilos) mais comuns das GSTs incluem: haletos de alquila, epóxidos, compostos  $\alpha,\beta$ -insaturados (como quinonas, iminoquinonas, aldeídos, cetonas, lactonas e ésteres), haletos de arila e nitro aromáticos (HUBER *et al.*, 2008). De forma geral, os substratos para a conjugação com a glutatona podem ser divididos em dois grupos: aqueles que são suficientemente eletrofílicos para serem conjugados diretamente e aqueles que primeiro precisam ser biotransformados em metabólito eletrofílico antes da conjugação (PARKINSON, 2008).

As reações catalisadas pelas GSTs representam importante mecanismo de defesa da célula e do organismo, atuando na eliminação de compostos xenobióticos tóxicos e eletrofílicos. Uma vez formados, os conjugados glutatona/xenobiótico são reconhecidos por transportadores específicos e conduzidos para o meio intercelular, onde são clivados pela ação das enzimas  $\gamma$ -glutamiltanspeptidase e dipeptidases presentes na porção externa da membrana celular. Alguns autores referem-se a estas etapas como a fase III do metabolismo de xenobióticos (HUBER *et al.*, 2008).

A primeira etapa de eliminação dos conjugados da glutatona envolve a remoção de um resíduo de ácido glutâmico pela  $\gamma$ -glutamiltanspeptidase. Posteriormente ocorre a clivagem de um resíduo de glicina por dipeptidases, restando apenas o resíduo da cisteína ligada ao xenobiótico. O glutamato e a glicina livres podem ser reabsorvidos pela célula e reutilizados na síntese de glutatona. O grupo amino do resíduo de cisteína presente no conjugado cisteína/xenobiótico é acetilado pela ação de N-acetiltransferases intracelulares, situadas principalmente

nos rins, dando origem aos conjugados da N-acetilcisteína, chamados em conjunto de ácidos mercaptúricos. Os ácidos mercaptúricos são conduzidos à circulação ou à bile. Dependendo das características da porção derivada do xenobiótico, o ácido mercaptúrico correspondente será diretamente excretado na urina ou necessitará de metabolização para ser eliminado (HUBER *et al.*, 2008).

As GSTs são encontradas no citoplasma, predominantemente, no retículo endoplasmático liso e em mitocôndrias das células da maioria dos órgãos, com concentração mais elevada no fígado, intestino, rins e pulmões (PARKINSON, 2008).

Apesar de serem, principalmente, enzimas de desintoxicação, muitos compostos químicos tornam-se farmacologicamente ou toxicologicamente ativos somente após sua transformação pelas enzimas biotransformadoras de xenobióticos. A ação das enzimas da Fase I, especialmente a oxidação de substâncias pelo complexo P450, pode gerar intermediários altamente tóxicos, como compostos eletrofílicos, mutagênicos e/ou carcinogênicos (HODGSON & ROSE, 2007). Dessa forma, a Fase I do metabolismo de xenobióticos é também conhecida como fase de ativação ou bioativação e as enzimas envolvidas nas Fases I e II do processo de biotransformação podem ser categorizadas em enzimas de ativação e de desintoxicação, respectivamente (CHEN & KONG, 2004).

As enzimas biotransformadoras de xenobióticos das Fases I e II coexistem numa mesma célula e o equilíbrio entre suas funções determina a adequada atividade biológica ou a toxicidade do xenobiótico (CHEN & KONG, 2004).

## **2.2 RADICAIS LIVRES E SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE**

Estruturalmente, moléculas são constituídas por átomos unidos por ligações químicas formadas por um par de elétrons. Quando estas ligações se desfazem, cada fragmento molecular passa a conter um único elétron não pareado em sua órbita externa, ávido por estabelecer nova ligação. Estes fragmentos carregados, altamente instáveis e quimicamente muito reativos constituem os radicais livres. Assim, define-se como radical livre qualquer átomo ou molécula orgânica ou

inorgânica que contém um ou mais elétrons não pareados no orbital externo, com existência independente (HALLIWELL, 1994).

Existem outras espécies que, embora não sejam radicais livres, podem induzir reações radicalares no organismo, sendo denominadas espécies reativas. Entre elas encontram-se o ânion peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), o ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e o ozônio ( $\text{O}_3$ ). As espécies reativas do oxigênio incluem radicais livres, como o ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $\text{HO}^{\cdot}$ ), radical alquila ( $\text{L}^{\cdot}$ ), alcóxila ( $\text{LO}^{\cdot}$ ) e peróxila ( $\text{LOO}^{\cdot}$ ). Nas espécies reativas do nitrogênio estão incluídos o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), o óxido nítrico ( $^{\cdot}\text{NO}$ ) e o radical dióxido de nitrogênio ( $^{\cdot}\text{NO}_2$ ) (LIMA & ABDALA, 2001).

As espécies reativas podem ter origem exógena e/ou endógena. Entre as fontes exógenas encontram-se as radiações ionizantes, como os raios gama e ultravioleta, e os xenobióticos (VASCONCELOS *et al.*, 2007). A formação de espécies reativas *in vivo* ocorre durante o metabolismo celular normal e exerce diferentes e importantes funções no organismo, em reações oxidativas de geração de energia pelas mitocôndrias na cadeia respiratória, no processo de desintoxicação de xenobióticos, na resposta fagocítica contra microrganismos, no metabolismo do ácido araquidônico na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, na oxidação da xantina no metabolismo do ácido úrico, em sistemas de sinalização celular e na indução da divisão celular (TKACZYK & VÍZEK, 2007; VALKO *et al.*, 2007).

As espécies reativas de oxigênio representam a mais importante classe de espécies radicais gerada em sistemas vivos (VALKO *et al.*, 2007). Dentre as principais espécies reativas de oxigênio, o radical superóxido apresenta baixa capacidade de oxidação, enquanto o radical hidroxila demonstra pequena capacidade de difusão, porém é o mais reativo. O peróxido de hidrogênio é relativamente estável, mas apresenta capacidade de migrar do seu sítio de origem, atravessando membranas e induzindo danos em moléculas de DNA e outras moléculas celulares (ANDERSON, 1996).

O metabolismo de xenobióticos é a segunda principal fonte de espécies reativas de oxigênio no organismo em reações catalisadas pelo complexo enzimático P450. Qualquer que seja o substrato oxidado pelo sistema P450, ocorre formação do radical superóxido como subproduto de oxidação. Dessa forma, o metabolismo

de xenobióticos gera como produtos secundários o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio (HARRIS, 2003).

As espécies reativas podem ser geradas no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, estando o dano celular causado por estas espécies associado com seu impacto sobre estruturas (lipoperoxidação de membrana, quebra da cadeia de DNA) ou funções celulares (alterações na atividade enzimática, nas vias de sinalização). Os efeitos das espécies reativas dependem de sua concentração; enquanto alterações estruturais necessitam de relativamente altas concentrações de espécie reativa no meio, menores concentrações podem modular processos celulares como proliferação, apoptose e necrose (TKACZYK & VÍZEK, 2007).

A exposição contínua a espécies reativas levou os organismos a desenvolverem mecanismos de defesas antioxidantes para limitar os níveis intracelulares dessas espécies e prevenir danos celulares por elas induzidos (VALKO *et al.*, 2007).

Os antioxidantes são definidos, de forma ampla, como qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada às do substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação deste substrato (HALLIWELL, 1994). De forma geral, são agentes endógenos ou exógenos que, agindo por diferentes mecanismos, retardam ou inibem a ocorrência de oxidações causadas pelos radicais livres nas células. Os antioxidantes podem atuar impedindo a formação de espécies reativas, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes também são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre lipídeos, aminoácidos das proteínas, dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e bases do DNA, evitando a formação de lesões e a perda da integridade celular. Outro mecanismo de proteção antioxidante é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Os agentes que protegem as células contra os efeitos oxidativos das espécies reativas podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. A glutathione peroxidase, a superóxido dismutase e a catalase fazem parte do sistema

de defesa antioxidante enzimático. Estas três enzimas estão envolvidas na eliminação direta de espécies reativas de oxigênio (radical hidroxila, radical superóxido e peróxido de hidrogênio), enquanto a glutathione redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase e GST citosólica são enzimas secundárias, que auxiliam na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio pela diminuição dos níveis de peróxido ou mantendo estável o suprimento de intermediários metabólicos, como glutathione e NADPH, necessários para ótimo funcionamento das enzimas antioxidantes primárias (SINGH *et al.*, 2004).

O sistema de defesa antioxidante não-enzimático é representado por antioxidantes que podem ser agrupados em compostos produzidos *in vivo*, como a glutathione, ubiquinona e ácido úrico, e em compostos obtidos diretamente da dieta, como o ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, flavonóides e outros (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A glutathione (GSH) é um tripeptídeo (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicina) que exerce funções essenciais na célula, destacando-se seu papel como cofator da família de enzimas glutathione peroxidase, em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a dissulfeto da glutathione (GSSG) (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A GSH é abundante no citosol, no núcleo e na mitocôndria e é o principal antioxidante solúvel nestes compartimentos celulares. A GSH no núcleo mantém o “estado redox” de proteínas sulfidrilas que são necessárias para o reparo e expressão do DNA. A glutathione oxidada é acumulada nas células e a taxa de GSH/GSSG é uma boa medida do estresse oxidativo do organismo (NOGUEIRA *et al.*, 2004).

A ação protetora da glutathione contra danos oxidativos está ligada à sua função como cofator de diferentes enzimas desintoxicadoras, como a glutathione peroxidase, GST e outras. Além disso, a GSH participa no transporte de aminoácidos através da membrana plasmática, remove radicais hidroxila e oxigênio singlete diretamente e age sobre o peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos por ação catalítica da glutathione peroxidase. A GSH é capaz de regenerar os principais antioxidantes da dieta, vitamina C e vitamina E, voltando-as às suas formas ativas, além de reduzir o radical tocoferol da vitamina E, diretamente ou indiretamente, via

redução do semi-desidroascorbato a ascorbato (MASELLA *et al.*, 2005). A capacidade de a GSH regenerar os mais importantes antioxidantes está ligada com o “estado redox” da glutathiona dissulfeto-glutathiona (GSSG/2GSH) (PASTORE *et al.*, 2003).

As espécies reativas operam em baixas, mas mensuráveis, concentrações nas células. Suas concentrações em estado estável são determinadas pelo balanço entre a velocidade de produção e de remoção pelos sistemas antioxidantes. Assim, cada célula é caracterizada por uma concentração particular de elétrons (“estado redox”) armazenada em alguns constituintes celulares e o “estado redox” de uma célula e sua oscilação determinam o funcionamento celular (SCHAFER & BUETTNER, 2001).

Sob condições normais, o “estado redox” de uma célula é mantido dentro de uma estreita faixa – de maneira semelhante à regulação do pH em sistemas biológicos. A capacidade intracelular de “homeostase redox” ou “tamponamento redox” é garantido pela GSH, juntamente com a família de proteínas denominada tiorredoxina. A glutathiona (GSSG/2GSH) representa o principal tampão redox celular e é um indicador representativo do ambiente redox da célula. Sob condições de estresse oxidativo, o maior conteúdo de GSSG aumenta os níveis de proteínas dissulfeto mistas. Várias proteínas envolvidas na sinalização que contêm tióis essenciais, como receptores, proteínas cinases e alguns fatores de transcrição, podem ser alteradas em sua função por formação de dissulfetos mistos. Dessa forma, GSSG parece agir como molécula de sinalização não específica (VALKO *et al.*, 2007).

A velocidade de conversão da glutathiona de sua forma oxidada para reduzida é mantida pela atividade da GR (VALKO *et al.*, 2007). A recuperação da GSH pela GR é uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular, estando baixas concentrações de GSH associadas ao estresse oxidativo (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Em adição à GSH e ao sistema tiorredoxina, existem outros antioxidantes de peso molecular relativamente baixo, que quando presentes em altas concentrações podem contribuir significativamente para a atividade de remoção de espécies

reativas. Estes incluem aminoácidos livres, peptídeos e proteínas (VALKO *et al.*, 2007).

### **2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA**

Apesar da atuação de potentes mecanismos de defesa antioxidantes dentro das células, estes podem ter sua capacidade de defesa superada pelos fatores oxidantes, resultando em acúmulo de espécies reativas. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes pode ser resultado de maior geração intracelular de espécies reativas, da deficiência dos mecanismos de defesa antioxidante ou de ambos (COSTA & MORADAS-FERREIRA, 2001), o que resulta na indução de danos celulares por espécies reativas. Esse processo é denominado estresse oxidativo (SIES, 1993).

A ocorrência de estresse oxidativo moderado é frequentemente acompanhada por uma resposta adaptativa do organismo, com aumento das defesas antioxidantes enzimáticas (ANDERSON, 1996). No entanto, em altas concentrações, espécies reativas podem causar danos oxidativos em diferentes biomoléculas como ácidos nucléicos, lipídios e proteínas. Modificações permanentes do material genético resultante destes danos oxidativos representam a primeira etapa envolvida na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (VALKO *et al.*, 2007).

A geração de espécies reativas resulta em ataque não somente sobre o DNA, mas também sobre outros componentes celulares. A reação de espécies reativas com ácidos graxos polinsaturados presentes em membranas celulares e lipoproteínas iniciam um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica, que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (LIMA & ABDALA, 2001).

A peroxidação lipídica envolve a formação e a propagação de radicais lipídicos, consumo de oxigênio, rearranjo das duplas ligações nos lipídios insaturados e a eventual destruição dos lipídios da membrana (BUEGE & AUST, 1978). O processo geralmente começa com a abstração de um átomo de hidrogênio (H<sup>•</sup>) de um grupo metileno alílico, normalmente de um ácido graxo polinsaturado,

deixando um elétron desemparelhado no carbono, caracterizando a iniciação da peroxidação lipídica. Este radical é usualmente estabilizado por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. O ataque por oxigênio molecular ao carbono radicalar do dieno conjugado produz o radical peroxila, que é capaz de abstrair H<sup>•</sup> da molécula de um lipídio adjacente, o que caracteriza a reação em cadeia da etapa de propagação da peroxidação lipídica. O radical peroxila combina-se com o H<sup>•</sup> abstraído, gerando hidroperóxido lipídico (LOOH) que, ao sofrer quebra, forma aldeídos como malondialdeído, 4-hidroxinonenalaldeído, entre outros. Na decomposição dos hidroperóxidos lipídicos são gerados radicais peroxila e alcoxila pela reação de Fenton. A terceira e última etapa da peroxidação lipídica, a etapa de terminação instala-se com a neutralização dos radicais formados por ação de antioxidantes lipossolúveis (alfa-tocoferol, beta-caroteno, NO<sup>•</sup>) ou pela reação de dois radicais lipídicos formando produtos não radicalares (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A peroxidação lipídica provoca alterações nas propriedades físicas e químicas das membranas, alterando sua fluidez e permeabilidade. Com isso, há perda da seletividade de troca iônica e de liberação do conteúdo de organelas (como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos). Pode ocorrer formação de produtos citotóxicos e expansão do líquido intracelular, com risco de ruptura das membranas da célula e das organelas, com conseqüente morte celular (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Os ácidos graxos polinsaturados são extremamente sensíveis à oxidação por radicais livres (VALKO *et al.*, 2007) e, por conterem grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, as membranas das células e das organelas celulares são mais suscetíveis à peroxidação lipídica (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Embora o radical livre inicial produza somente efeitos locais, os radicais posteriores e os produtos de degradação causam efeitos biológicos distantes do local onde o primeiro radical foi produzido (SOUTHORN & POWIS, 1988).

Acredita-se que o estresse oxidativo associado às espécies reativas esteja envolvido não somente na toxicidade dos xenobióticos, mas também no papel patogênico do envelhecimento da pele e diferentes tipos de doenças, como cardiovasculares, inflamatórias, respiratórias, neurológicas e câncer (SINGH *et al.*, 2004; VALKO *et al.*, 2007).

## 2.4 CICLO CELULAR E APOPTOSE

O ciclo celular consiste em uma sequência complexa de eventos pelos quais as células crescem e multiplicam-se. A inicialização, a progressão e a finalização dos eventos do ciclo celular, bem como a integridade da célula, são monitoradas por pontos de controle (GARRETT, 2001). Estes pontos de controle, que constituem os mecanismos reguladores do crescimento celular, garantem a homeostase e a renovação tecidual pelo equilíbrio entre a proliferação, a estabilização e a morte celular (FOSTER, 2008).

O estímulo para a proliferação celular começa com a liberação de fatores de crescimento a partir de uma célula. Estes fatores se ligam a receptores na membrana celular. Os sinais são transmitidos através da membrana para proteínas citoplasmáticas, que, por sua vez, sinalizam a liberação de fatores de transcrição dentro do núcleo. Esta sequência de eventos conduz as células pelo ciclo celular (FOSTER, 2008).

Células que são submetidas à replicação movem-se da fase G1 (*Gap 1*) do ciclo para a fase S, na qual ocorre síntese de DNA. A fase S é seguida pela fase G2 (*Gap 2*), na qual as células se preparam para a duplicação, que ocorre na fase M (mitose) (GARRET, 2001).

A progressão das células pelas fases do ciclo celular é controlada por quinases dependentes de ciclina (CDKs), uma família de proteínas quinases que são ativadas em pontos específicos do ciclo celular pela ligação de ciclinas. As ciclinas são subunidades regulatórias sintetizadas e destruídas em pontos específicos do ciclo celular. Dessa forma, enquanto os níveis de CDKs permanecem estáveis ao longo do ciclo, os níveis de ciclinas variam, ativando ou não as CDKs. Quando as CDKs estão ativas, proteínas alvos tornam-se fosforiladas, resultando em alterações que são fisiologicamente relevantes para a progressão no ciclo celular. O substrato de CDKs mais frequentemente estudado é o produto do gene supressor de tumor retinoblastoma (pRb) (VERMEULEN *et al.*, 2003; MALUMBRES & BARBACID, 2009).

A atividade das CDKs é contrabalanceada por proteínas inibidoras do ciclo celular, conhecidas como inibidoras de CDKs. Estas inibidoras se ligam às CDKs ou

ao complexo ciclina-CDK, regulando a atividade destes (MALUMBRES & BARBACID, 2009).

Sob circunstâncias normais, enquanto houver necessidade de proliferação, o ciclo celular prossegue sem interrupções. No entanto, quando algum dano é detectado, as células interrompem a proliferação na fase G1, S ou G2, prosseguindo no ciclo celular somente depois que o dano é reparado. Se este reparo não ocorre em tempo hábil, as células podem abortar a mitose e sofrer apoptose ou entrar em estado irreversível semelhante a G0 (SHACKELFORD *et al.*, 1999).

Distúrbios no equilíbrio entre proliferação e morte celular podem resultar em hiperplasia ou neoplasia. Enquanto a hiperplasia é um processo reversível, nas células neoplásicas o desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular é irreversível, mantendo-se mesmo quando removido o estímulo para a proliferação. As células neoplásicas são caracteristicamente independentes de estímulos mitogênicos devido a mutações em vias de sinalização intracelular. Tal independência facilita a re-entrada destas células no ciclo celular, independentemente de estímulos externos positivos ou negativos (FOSTER, 2008).

A suscetibilidade celular em acumular mutações potencialmente oncogênicas, resultando em carcinogênese, depende da frequência de alterações espontâneas ou induzidas nos genes e da capacidade celular de proteger e reparar o DNA, preservando a integridade e a estabilidade do genoma. Isto envolve a resposta celular aos estímulos do microambiente, bem como o controle do ciclo celular e da apoptose (ENGELBERGS *et al.*, 2000; COATES *et al.*, 2005).

As mutações associadas à carcinogênese ocorrem principalmente em proto-oncogenes e genes supressores de tumor (FOSTER, 2008). Em alguns casos, uma única alteração em um par de bases é suficiente para ativar, silenciar ou alterar funcionalmente estes tipos de genes (ENGELBERGS *et al.*, 2000). Mutações ou modificações na expressão destes genes críticos no controle da proliferação e da diferenciação celular criam instabilidade no genoma, aumentando as possibilidades de novas mutações por inibirem o reparo genômico. O acúmulo de mutações acaba por conferir às células vantagens de crescimento e desenvolvimento em relação às normais (VERMEULEN *et al.*, 2003).

O destino da célula com dano no DNA, seja progressão no ciclo celular ou apoptose, é determinado pela extensão do dano e pelo nível de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular e na indução da apoptose (FOSTER, 2008; CHEN *et al.*, 2010).

A apoptose é um processo ativo de morte celular que desempenha importante papel no desenvolvimento de organismos multicelulares e na regulação e manutenção das populações de células em tecidos sob condições fisiológicas e patológicas (CHO & CHOI, 2002).

Os mecanismos de estímulo da apoptose são altamente complexos e sofisticados, envolvendo duas vias principais: a via extrínseca ou dos receptores de morte e a via intrínseca ou mitocondrial. A via de sinalização extrínseca envolve interações mediadas por receptores transmembrana, que são ativados em resposta à união de ligantes específicos. A maioria dos receptores de morte identificados é membro da superfamília de receptores para o fator de necrose tumoral. Estes são caracterizados por apresentarem um domínio extracelular rico em cisteína e um domínio citoplasmático, chamado domínio de morte. Este domínio de morte é essencial na transmissão do sinal de morte da superfície celular para as vias de sinalização intracelular (PAROLIN & REASON, 2001; ELMORE, 2007).

A via intrínseca é desencadeada em resposta a estímulos gerados dentro da célula que resultam em disfunção mitocondrial, como ativação de genes supressores de tumor, lesão no DNA, alterações nas vias metabólicas (aumento do cálcio intracelular, redução do pH, estresse oxidativo), drogas, toxinas ou privação de fatores de crescimento (PAROLIN & REASON, 2001; RIEDL & SHI, 2004).

Na presença de sinais de estresse intracelular ocorrem alterações no interior da membrana mitocondrial que resulta na abertura de poros de transição da permeabilidade mitocondrial, perda do potencial transmembrana e liberação de proteínas pró-apoptóticas a partir do espaço intermembrana para dentro do citosol (RIEDL & SHI, 2004; ELMORE, 2007). Entre estas proteínas pró-apoptóticas, a citocromo c é bem caracterizada. A ligação do citocromo c ao fator de ativação da protease apoptótica no citoplasma induz alteração conformacional que permite a esta última se ligar ao ATP/dATP e formar o apoptosomo, que medeia a ativação da

caspase-9 e', assim, dispara a cascata de ativação de caspases efetoras (RIEDL & SHI, 2004).

As vias extrínsecas e intrínsecas convergem para a mesma via terminal, conhecida como via de execução, que se inicia pela clivagem da caspase-3 e resulta em fragmentação do DNA, degradação do citoesqueleto e de proteínas nucleares, ligação cruzada de proteínas, formação de corpos apoptóticos, expressão de ligantes para receptores de células fagocíticas e finalmente captura por células fagocíticas (ELMORE, 2007).

O controle e regulação dos eventos mitocondriais apoptóticos ocorrem por membros da família de proteínas Bcl-2. A família de proteínas Bcl-2 controla a permeabilidade da membrana, podendo ser pró ou anti-apoptótica. Entre as proteínas anti-apoptóticas encontram-se: Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w e BAG, enquanto as proteínas pró-apoptóticas incluem: Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik e Blk. A importância destas proteínas se deve à capacidade de determinarem se a célula entra em apoptose ou aborta o processo (ELMORE, 2007).

A proteína supressora de tumor p53 exerce importante papel na regulação da família de proteínas Bcl-2, embora os mecanismos não estejam completamente elucidados (ELMORE, 2007). Além disso, a proteína supressora de tumor p53 age em diferentes níveis do ciclo de proliferação e morte celular, desempenhando papel crucial na manutenção da estabilidade do genoma em células somáticas e na prevenção da formação do tumor. A proteína p53 age como fator de transcrição de sequência específica do DNA e regula respostas celulares adequadas a vários sinais de estresse (HU, 2009). Mutações em oncogenes e danos ao DNA causados por químicos ou radiação podem induzir o acúmulo da proteína p53 em células normais. O acúmulo desta proteína dispara a transcrição de diferentes genes que causam a interrupção do ciclo celular para permitir o reparo do DNA ou conduzem a célula à apoptose (CHEN *et al.*, 2010). Estas respostas a níveis aumentados de p53 eliminam células com genoma danificado ou mutado antes destas se tornarem tumorais (HU, 2009). Por outro lado, na ausência de p53 funcional, células danificadas podem prosseguir no ciclo celular, acumulando mutações, que passam despercebidas pelos pontos de controle, gerando tumores (FOSTER, 2008).

Células apoptóticas apresentam alterações morfológicas que são consequências de eventos moleculares e bioquímicos característicos. A ativação de proteases endógenas compromete a integridade do citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular. As células inicialmente se retraem, tornando-se densas, devido à clivagem das lâminas e filamentos de actina no citoesqueleto e à perda de estruturas juncionais. A membrana celular sofre alterações como a formação de vesículas e a translocação da fosfatidilserina da superfície interna para a superfície externa da membrana. O novo posicionamento da fosfatidilserina serve como sinalizador para que células fagocíticas das proximidades englobem os fragmentos celulares e completem o processo de degradação celular. Ocorrem também alterações características no núcleo celular que envolve a condensação e a marginalização da cromatina. Devido à ativação de endonucleases ocorre clivagem do DNA e o núcleo fragmenta-se. Simultaneamente, a célula é fragmentada em pequenas estruturas circundadas por membrana, contendo partes do núcleo e organelas intactas, denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são fagocitados pelos macrófagos teciduais ou células vizinhas, sendo digeridos pelos lisossomos celulares. Dessa forma, os corpos apoptóticos são removidos com mínimo comprometimento do tecido adjacente (PAROLIN & REASON, 2001).

Para o organismo, a apoptose constitui processo pelo qual células com danos genéticos não reparados, não necessárias ou que não respondem aos estímulos proliferativos podem ser rapidamente removidas (KONG *et al.*, 2001), desempenhando importante papel na proteção contra a transformação maligna e o desenvolvimento da neoplasia (FOSTER, 2008).

## **2.5 CARCINOGENESE QUÍMICA**

Carcinogênese é um termo genérico que compreende os vários mecanismos que participam do desenvolvimento de neoplasias malignas (PERES *et al.*, 2003). Ela pode ocorrer de forma espontânea ou ser induzida por agentes físicos, químicos, biológicos ou genéticos (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A carcinogênese química pode ser induzida por carcinógenos diretos ou indiretos. Os carcinógenos diretos são substâncias alquilantes ou acilantes com atividade eletrofílica intrínseca, enquanto os indiretos são metabolizados para compostos ativos eletrofílicos durante o processo de biotransformação (LUCH, 2005). Tais substâncias eletrofílicas são atraídas por moléculas com alta densidade de elétrons, como são as bases do DNA, às quais se ligam e levam à formação de adutos. Sendo formados por mecanismos químicos específicos, tais adutos podem levar a mutações em proto-oncogenes ou em genes supressores de tumor (LOUREIRO *et al.*, 2002). Os adutos podem também modular a atividade do gene sem alterar a sequência do DNA, mas alterando a expressão genética resultante (GOODMAN & WATSON, 2002).

Na carcinogênese química, durante a biotransformação do carcinógeno, a oxidação do substrato pela cadeia respiratória nas mitocôndrias resulta em formação de espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo que acompanha a metabolização dos carcinógenos pode causar dano adicional ao DNA. A atividade potencial de um carcinógeno, de fonte endógena ou exógena, depende fortemente da sua biotransformação/bioativação no organismo. Assim, alterações na expressão de genes e/ou na atividade de enzimas relevantes para a modificação estrutural dos carcinógenos podem ter forte influência sobre as consequências da carcinogênese induzida quimicamente (CHEN & KONG, 2004).

A carcinogênese é um processo de múltiplos estágios, no qual ocorre a transformação sequencial de células normais para malignas via algumas populações de células intermediárias. A formação e o desenvolvimento destas populações intermediárias de células resultam das etapas de iniciação, promoção e progressão da carcinogênese (LOUREIRO *et al.*, 2002).

A iniciação é caracterizada por alteração irreversível no DNA e envolve uma cadeia de eventos extracelulares e intracelulares. Na carcinogênese química, a iniciação inclui captação ou exposição inicial ao carcinógeno, sua distribuição e transporte aos órgãos e tecidos onde ocorre ativação metabólica e interação covalente das espécies reativas com o DNA de células-alvo, levando ao dano genotóxico (SURH, 2003).

Somente a ocorrência de alterações genéticas não é suficiente para que ocorra a iniciação da carcinogênese. É necessário que haja a replicação do DNA seguida de proliferação celular antes que ocorra reparo ao DNA, de modo que a mutação inicial se torne permanente (LOUREIRO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O estágio de promoção é caracterizado pela expansão clonal das células iniciadas, resultando na formação de lesões, que são precursoras potenciais para as etapas subsequentes no processo carcinogênico (RIZZI *et al.*, 1997).

Durante a promoção do tumor, as células apresentam alteração na expressão de genes que regulam a diferenciação e o crescimento celular, resultando em ativação aberrante do ciclo celular e aumento reversível da proliferação (GOODMAN & WATSON, 2002; LOUREIRO *et al.*, 2002; KHAVARI *et al.*, 2010).

Diferentemente da iniciação, o estágio de promoção pode ser continuamente modulado por fatores ambientais, incluindo a frequência de administração do agente promotor, a composição e a quantidade da dieta (PITOT & DRAGAN, 1991). A reversibilidade deste estágio, o longo período de latência e a possibilidade de modulação por fatores ambientais tornam a promoção uma etapa estratégica para a ação de agentes quimioprotetores contra o câncer (PERES *et al.*, 2003).

Finalmente, a progressão da célula pré-maligna para maligna é um processo irreversível e ocorre em consequência de dano adicional ao DNA, resultando em proliferação celular incontrolada devido à reduzida dependência dessas células aos fatores de crescimento (PERES *et al.*, 2003).

O estágio da progressão é caracterizado por instabilidade genética e contínua evolução para formação neoplásica. Tais alterações na estrutura do genoma da célula neoplásica durante a progressão estão diretamente relacionadas ao aumento da velocidade de crescimento celular, ao crescimento autônomo, à capacidade de invasão e de originar metástase e às alterações nas características bioquímicas, metabólicas e morfológicas nas células malignas. Estas alterações, como reflexo da instabilidade genômica, continuam a evoluir (progredir) durante o estágio de progressão (PITOT & DRAGAN, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A carcinogênese é um processo caracterizado pelo acúmulo de alterações genéticas e/ou epigenéticas e pela seleção de células geneticamente instáveis que

evadem dos mecanismos reguladores do ciclo e morte celular (ENGELBERGS *et al.*, 2000). Dessa forma, o câncer pode ser mais precisamente descrito como sendo o produto do mau funcionamento na regulação do ciclo celular, de forma que células danificadas ou mutadas, que normalmente seriam mortas, prosseguem no ciclo celular, proliferando e acumulando mutações (FOSTER, 2008).

## **2.6 HEPATOCARCINOGENESE EXPERIMENTAL E MODELO HEPATÓCITO RESISTENTE**

O fígado tem se destacado como o principal órgão alvo para estudo das diferentes etapas da carcinogênese química experimental (ESPANDIARI *et al.*, 2005). Estudos sobre a etiologia dos tumores hepáticos experimentais têm sido relevantes e de grande interesse, uma vez que carcinógenos com ação no ser humano agem também em animais de experimentação (CLAYSON & ARNOLD, 1991). Assim, a indução de câncer em roedores é considerada indicador válido de risco de câncer para o homem, não somente para o câncer hepático, mas também em outros órgãos (ENGELBERGS *et al.*, 2000). Além disso, modelos de hepatocarcinogênese química em ratos são reconhecidos e recomendados pelo *International Life Sciences Institute* para testes de substâncias carcinogênicas e estudos de quimioprevenção (ITO *et al.*, 2003).

Focos de hepatócitos alterados em proliferação são vistos em virtualmente todos os modelos de carcinogênese hepática experimental. Estes focos aparecem como pequenas coleções microscópicas durante ou imediatamente após a iniciação com diferentes carcinógenos. Após exposição adicional a carcinógenos ou a outro ambiente promotor eles crescem, tornando-se nódulos macroscopicamente visíveis (TATEMATSU *et al.*, 1983). Os focos de hepatócitos alterados e nódulos hepáticos hiperplásicos decorrem da expansão clonal de hepatócitos iniciados e precedem o aparecimento do tumor, sendo estes denominados lesões pré-neoplásicas (LPN) (DRAGAN & PITOT, 1992).

De acordo com a classificação de lesões hepáticas por SQUIRE & LEVITT (1975), focos e áreas de alteração celular são lesões constituídas por células com

alterações na coloração e textura citoplasmáticas vistas em cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina. Os focos e as áreas diferem somente quanto ao tamanho ocupado por estas lesões no parênquima hepático. Os focos são lesões menores do que um lóbulo, enquanto as áreas são lesões de tamanho igual ou superior a um lóbulo. Nestas lesões não ocorre alteração nítida da arquitetura hepática e as trabéculas de hepatócitos alterados fundem-se sem demarcação com o parênquima ao redor. As células alteradas podem ser maiores ou menores do que o hepatócito normal. Os núcleos podem ser maiores, vesiculares ou hiper cromáticos e com nucléolo aumentado.

Os nódulos são lesões esféricas que geralmente ocupam área equivalente a alguns lóbulos hepáticos. Os hepatócitos dentro dos nódulos são similares àqueles vistos nos focos ou áreas. Algumas vezes estão presentes mitoses e graus variados de atipia nuclear, caracterizados por aumento, hiper cromasia, duplicação e nucléolo aumentado. Um aspecto importante do nódulo é a distorção da arquitetura e nítida demarcação do fígado adjacente. As células podem estar em arranjos sólidos desordenados em uma ou mais fileiras de células. Os sinusóides podem estar comprimidos pelos hepatócitos aumentados ou mostrar variados graus de ectasia. Tratos portais geralmente estão ausentes ou, em raros casos, encontram-se ao lado dos nódulos. As lâminas de células dos nódulos são geralmente descontínuas com as do parênquima normal, que se apresentam estreitadas devido à compressão pelo nódulo em expansão. Estes nódulos são lesões proliferativas e, no mínimo, representam aumento da probabilidade de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (SQUIRE & LEVITT, 1975).

As LPN, embora constituídas de hepatócitos semelhantes morfologicamente aos originais, mostram características bioquímicas diferentes daquelas dos hepatócitos originais em qualquer estágio de desenvolvimento hepático normal (TATEMATSU *et al.*, 1983). Estas características incluem deficiência de alguns marcadores enzimáticos como adenosiltrifosfatase, glicose-6-fosfatase, serina desidratase e  $\beta$ -glicuronidase e elevação de outros como  $\gamma$ -glutamiltanspeptidase, DT-diaforase e GST placentária (SCHERER & EMMELLOT, 1975; OGAWA *et al.*, 1980; HANIGAN & PITOT, 1985; SATOH *et al.*, 1985).

Uma propriedade característica da hepatocarcinogênese experimental é que a maioria dos focos e nódulos de hepatócitos fenotipicamente alterados (93% a 98%) sofre remodelação para uma aparência de fígado normal, num processo muito complexo que envolve estrutura e arquitetura celular, suprimento sanguíneo e propriedades bioquímicas, enquanto um pequeno subgrupo destas LPN persiste e prolifera, podendo progredir para carcinoma hepatocelular (RIZZI *et al.*, 1997).

Diversos modelos *in vivo* são descritos para o estudo da hepatocarcinogênese química experimental. No entanto, apesar de produzirem alta incidência de neoplasias malignas, nem todos os modelos mostram-se satisfatórios na avaliação da carcinogênese por requererem, muitas vezes, longos períodos de experimentação para a visualização final das lesões. A falta de sincronismo do aparecimento das lesões também é fator limitante de vários modelos, visto que a análise sequencial de qualquer processo em múltiplas etapas, sejam elas molecular, bioquímica, genética ou biológica, necessita de um sistema sincronizado, especialmente quando se objetiva estabelecer relação precursor-produto em cada etapa (FARBER, 1995).

O modelo hepatócito resistente (HR), descrito por SOLT & FARBER (1976), consiste na iniciação da hepatocarcinogênese por dose única de dietilnitrosamina (DEN) ou outro carcinógeno e seleção para proliferação dos hepatócitos iniciados por breve exposição ao 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) associada a estímulo mitogênico, como a hepatectomia parcial (HP).

Considerando que os hepatocarcinógenos inibem a proliferação celular e em altas doses podem levar à morte celular, o princípio do modelo baseia-se na constatação de que em ambiente citotóxico, como o criado pelo 2-AAF, somente os hepatócitos iniciados pela DEN responderão ao estímulo mitogênico da hepatectomia. Dessa forma, o crescimento seletivo de hepatócitos iniciados resultaria de sua relativa resistência à ação citotóxica dos carcinógenos hepáticos (SOLT & FARBER, 1976).

Algumas vantagens têm sido descritas para o modelo HR em relação aos demais modelos de hepatocarcinogênese experimental. Com a inibição da proliferação de quase todos os hepatócitos pelo 2-AAF, os hepatócitos resistentes (iniciados) respondem ao estímulo mitogênico da hepatectomia, proliferam

rapidamente e aparecem como lesões focais visíveis macro e microscopicamente dentro de sete a 10 dias após a HP (SOLT & FARBER, 1976; OGAWA *et al.*, 1980; ENOMOTO & FARBER, 1982). Devido à intensidade da seleção, os hepatócitos resistentes proliferam sincronizados de forma que muitos nódulos aparecem e crescem em grupo (OGAWA *et al.*, 1980). Este sincronismo dos estágios da carcinogênese hepática permite análise sequencial do processo (ENOMOTO & FARBER, 1982; TATEMATSU *et al.*, 1983).

Em adição, esse protocolo de hepatocarcinogênese em ratos é particularmente adaptado (MORENO *et al.*, 1995) e extensamente utilizado para avaliar o efeito de compostos potencialmente capazes de modular o processo carcinogênico (ESPÍNDOLA *et al.*, 2005; FONSECA *et al.*, 2005; ONG *et al.*, 2006; MORENO *et al.*, 2007; SAMPAIO *et al.*, 2007).

## **2.7 CAFÉ, CONTITUENTES E QUIMIOPROTEÇÃO**

O cafeeiro pertence à família botânica Rubiaceae, constituída por aproximadamente 500 gêneros e cerca de 6.000 espécies. Dentre as espécies mais importantes economicamente destacam-se *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* L., conhecidas como café arábica e café robusta, respectivamente (ICO, 2005). Tendo origem no Oriente Médio há mais de mil anos, o café só chegou ao Brasil em 1727, trazido da Guiana Francesa através da fronteira paraense. Plantado inicialmente no norte do país sem grande sucesso, o cultivo chega ao Vale do Paraíba em São Paulo, região cujas terras férteis e clima favorável transformaram o país no maior produtor mundial a partir do final do século XIX. Ainda hoje, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor, atrás apenas dos Estados Unidos (ABIC, 2011).

O café é importante fonte de renda para a economia brasileira e de muitos países latino-americanos, africanos e asiáticos, por sua participação na receita cambial, transferência de renda aos outros setores da economia, contribuição à formação de capital no setor agrícola e pela expressiva capacidade de absorção de mão-de-obra (EMBRAPA, 2005).

O café é ainda um dos mais valiosos produtos na economia global, sendo o produto mais consumido no mundo e o segundo maior mercado depois do petróleo, movimentando anualmente recursos na ordem de bilhões de dólares (ABIC, 2011).

O consumo mundial do produto levou ao desenvolvimento de estudos relacionados à atividade biológica do grão, principalmente torrado, e de seus constituintes, como ácidos clorogênicos, taninos, cafeína e diterpenos. Estes constituintes têm sido sugeridos como potencialmente quimioprotetores em diferentes sistemas químicos e biológicos.

Os ácidos clorogênicos constituem os principais e mais abundantes compostos fenólicos com propriedades antioxidantes no café. Eles compreendem uma família de compostos fenólicos e seus isômeros, formados principalmente pela esterificação do ácido quínico com um dos ácidos derivados do ácido cinâmico: o ácido caféico, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico (MONTEIRO & TRUGO, 2005).

No tratamento térmico do grão de café ocorre degradação parcial de polifenóis de ocorrência natural, mas favorece a formação, principalmente na reação de Maillard, de outros compostos heterocíclicos voláteis com potente atividade antioxidante (DAGLIA *et al.*, 2004; YANAGIMOTO *et al.*, 2004). Estes compostos encontrados na infusão de café – pirróis, furanos, tiofenos, pirazinas, imidazóis – são dotados de potente atividade antioxidante, sendo atribuído a algumas destas frações potencial semelhante ao encontrado para o  $\alpha$ -tocoferol (FUSTER *et al.*, 2000; YANAGIMOTO *et al.*, 2004).

O ácido tânico, outro constituinte do café, faz parte de um grupo heterogêneo de polifenóis denominado taninos. A ingestão dietética de ácido tânico em baixas doses apresenta forte atividade quimioprotetora contra o desenvolvimento espontâneo de neoplasias hepáticas em camundongos (NEPKA *et al.*, 1999; TAITZOGLOU *et al.*, 2000).

A cafeína é o mais conhecido constituinte do café devido às suas propriedades fisiológicas e farmacológicas. É um alcalóide farmacologicamente ativo pertencente ao grupo das xantinas, altamente resistente ao calor, inodoro e com sabor amargo bastante característico que contribui de forma importante para o sabor e aroma do café (MONTEIRO & TRUGO, 2005). Seu consumo em baixas a moderadas doses pode resultar em efeito estimulante do sistema nervoso central,

com possível diminuição do sono e aumento na capacidade de concentração. No entanto, em altas doses e em indivíduos com sensibilidade aumentada, a cafeína pode causar efeitos negativos como ansiedade, inquietação, insônia e taquicardia (NEHLIG, 1999). Além de exercer efeito sobre o sistema nervoso central, a cafeína é outro constituinte do café com atividade antioxidante e mostra efetiva inibição da peroxidação lipídica *in vitro* induzida por espécies reativas de oxigênio em microsomas de fígado de rato expostos à radiação, sendo seu potencial antioxidante semelhante ao da glutathione e superior ao do ácido ascórbico (DEVASAGAYAM *et al.*, 1996).

O cafeol e cafestol são constituintes da fração lipídica do café e estão presentes no grão e também na bebida. A concentração destes compostos na bebida depende fortemente do processo de preparo, aparecendo em quantidade mais elevada em cafés não-filtrados, como o café turco ou escandinavo, em menor valor no café expresso e praticamente inexistente no café filtrado (GROSS *et al.*, 1997). Estes diterpenos são também considerados bons exemplos de constituintes biologicamente ativos encontrados no café. Estudos mostram que estes compostos protegem contra a formação de adutos no cólon de animais (HUBER *et al.*, 1997) e em diferentes sistemas de células humanas e animais, exercendo efeito protetor antimutagênico e anticarcinogênico (CAVIN *et al.*, 1998; CAVIN *et al.*, 2001; CAVIN *et al.*, 2003; MAJER *et al.*, 2005). As atividades quimioprotetoras do cafeol e cafestol parecem estar associadas com modificações benéficas no metabolismo de xenobióticos que incluem inibição de enzimas da P450, com consequente redução na ativação de substâncias mutagênicas/carcinogênicas (CAVIN *et al.*, 1998; CAVIN *et al.*, 2001), e indução de enzimas da FASE II do metabolismo de xenobióticos, como a GST e a UDPGT (HUBER *et al.*, 2002<sub>a</sub>; HUBER *et al.*, 2003). O cafeol e cafestol também aumentam os teores de glutathione, o cofator da desintoxicação relacionada à GST, e de  $\gamma$ -glutamilcisteína-sintetase, a enzima limitante da síntese de glutathione (HUBER *et al.*, 2002<sub>b</sub>; HUBER *et al.*, 2003).

Além de estudos sobre atividade quimioprotetora dos constituintes do café, o consumo de café está inversamente associado com o risco de câncer em diferentes órgãos como mama (KERMODE-SCOTT, 2006), faringe, esôfago (TAVANI *et al.*,

2003) e fígado (GELATTI *et al.*, 2005; INOUE *et al.*, 2005; SHIMAZU *et al.*, 2005; OHFUJI *et al.*, 2006; TANAKA *et al.*, 2007).

Em experimentos animais ficou demonstrado que a ingestão de café causa aumento na atividade da  $\gamma$ -glutamilcisteína-sintetase, enzima limitante da síntese de glutathiona, e de enzimas da FASE II do metabolismo de xenobióticos, como as GSTs e as UDPGTs (HUBER *et al.*, 2003), além de ativação do sistema de antioxidação endógeno, conduzindo ao aumento hepático dos teores de glutathiona, inibindo a peroxidação lipídica e protegendo o fígado de ratos da ação hepatotóxica do paracetamol (ABREU & MORAES-SANTOS, 2011). Ainda, em estudo recente, ratos alimentados com dieta suplementada com café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese HR apresentaram redução em mais de 70% no número de LPN e na área ocupada por estas lesões, indicando efeito modulador do café sobre a carcinogênese hepática (SILVA-OLIVEIRA *et al.*, 2010).

## **2.8 RESTRIÇÃO CALÓRICA E MODULAÇÃO DA CARCINOGENESE**

Segundo KRITCHEVSKY (1993), Lucretius (~50 a.C.) foi o primeiro a referir sobre o papel do excesso de alimentação no envelhecimento prematuro e na etiologia de doenças degenerativas. No entanto, os primeiros testes usando modelos animais datam de 1909, quando MORESCHI mostrou que a restrição calórica inibiu o crescimento de tumores transplantados em camundongos (LONGO & FONTANA, 2010).

Maior interesse na restrição calórica ocorreu a partir de 1940, com experimentos que encontraram redução em 50% ou mais na incidência de tumores espontâneos na glândula mamária, no pulmão e no fígado de camundongos submetidos à restrição alimentar (HURSTING & KARI, 1999). A partir de então, a restrição calórica tem sido extensamente estudada como a mais potente intervenção fisiológica para estender a vida e proteger contra a carcinogênese em modelos experimentais (HURSTING *et al.*, 2003).

Em roedores, a redução de 15%-53% na ingestão calórica *ad libitum* usual resulta em redução linear proporcional de 20%-62% na incidência de tumores

(ALBANES, 1987). Corroborando os resultados observados em roedores, estudos mostraram que macacos submetidos à restrição calórica apresentaram menor incidência de câncer e de outras doenças crônico-degenerativas, como diabetes, doença cardiovascular e doenças auto-imunes, quando comparados aos animais controle alimentados *ad libitum* (ROTH *et al.*, 1999; LANE *et al.*, 2001; COLMAN *et al.*, 2009).

A restrição calórica inibe diferentes tipos de neoplasias espontâneas em modelos experimentais (CONYBEARE, 1980; YU *et al.*, 1985). A restrição calórica também suprime a ação carcinogênica de várias classes de compostos químicos em roedores, incluindo agentes alquilantes e metilantes, como a DEN (LAGOPOULOS & STALDER, 1987), e aminas aromáticas (DUNN *et al.*, 1997). Em adição, a restrição calórica inibe várias formas de câncer induzidos por radiação (GROSS & DREYFUSS, 1984; GROSS & DREYFUSS, 1990). Assim, a ação inibitória da restrição calórica sobre a carcinogênese é verificada em várias espécies, para diferentes tipos de tumores, tanto para aqueles quimicamente induzidos quanto para neoplasias espontâneas.

A restrição calórica, também conhecida como restrição alimentar, restrição dietética ou restrição de energia, é definida como uma redução na ingestão de calorias em relação à ingestão *ad libitum* usual, sem desnutrição (HURSTING *et al.*, 2003; KEMNITZ, 2011). Experimentos que utilizam regimes alimentares de restrição calórica devem prover adequadamente os nutrientes essenciais, limitando somente a ingestão total de energia pelos animais, geralmente em 20%-40%. Para evitar efeitos de viés da desnutrição, estudos sobre os efeitos da restrição calórica devem garantir adequado estado nutricional. Estima-se que a redução calórica de 20%-30% relativa a dieta *ad libitum* seja equiparada a um nível de ingestão normal saudável (HURSTING *et al.*, 2003).

Entre os mecanismos sugeridos para a modulação da carcinogênese pela restrição alimentar encontram-se adaptações metabólicas à restrição alimentar, incluindo: a) menor produção de espécies reativas de oxigênio e modulação do sistema antioxidante endógeno, com redução do estresse oxidativo e do dano ao DNA por radicais livres; b) menor produção de fatores de crescimento e hormônios anabólicos; c) menores concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias e

aumento nos corticosteróides circulantes e d) proteção contra deterioração da imunovigilância associada ao envelhecimento (LONGO & FONTANA, 2010).

Em adição, a restrição calórica afeta múltiplos processos envolvidos na patogênese do câncer, incluindo aumento dos processos de reparo de DNA, aumento da remoção de células danificadas por apoptose e modulação nos sistema de biotransformação, protegendo o organismo contra efeitos danosos de compostos xenobióticos. Além disso, alguns dos efeitos da restrição calórica são provavelmente mediados pelo aumento da expressão de genes, como genes supressores de tumor, genes promotores de reparo do DNA e genes antioxidantes. Efeitos da restrição calórica podem ser também mediados pela sub-regulação de genes pró-inflamatórios e modulação das vias do metabolismo energético (HURSTING & KARI, 1999; LONGO & FONTANA, 2010).

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 EQUIPAMENTOS**

Banho com agitação e temperatura regulável Yamato modelo BT-25 (Tóquio, Japão), câmera digital Sony modelo DSC-W7 7.2 Megapixels (Tóquio, Japão), centrífuga refrigerada Hitachi modelo CR-21 (Hitachinaka, Japão), espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001 (Hitachinaka, Japão), estufa de esterilização e secagem Nova Ética modelo 420-D (Vargem Grande Paulista, SP, Brasil), micro-moinho tipo Willye Tecnal modelo Te-648 (Piracicaba, SP, Brasil), microscópio ótico binocular Olympus Optical do Brasil, modelo BX41 (São Paulo, SP, Brasil), programa de análise de imagens Image-Pro Plus Media Cybernetics versão 4.5.0.29 (Bethesda, MD, EUA).

### **3.2 REAGENTES QUÍMICOS**

O 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) foi adquirido da Acros Organics (Geel, Bélgica), o anticorpo primário de camundongo anti-antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) da Biocare Medical (Concord, CA, EUA), o anticorpo secundário biotilado anti-IgG de camundongo da Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, EUA), a diaminobenzidina (DAB) da Novocastra Laboratories (Newcastle, Inglaterra) e o complexo avidina-biotina Vectastain Elite da Vector Laboratories (Burlingame, CA, EUA).

Os reagentes: ácido ditionitrobenzóico (DTNB), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido glicurônico difosfato uridina (UDP-ácido glicurônico), albumina bovina, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), dietilnitrosamina (DEN), glutationa oxidada (GSSG), glutationa reduzida (GSH), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida (NADPH) e *p*-nitrofenol foram adquiridos da Sigma Chemical CO (St. Louis, MO, EUA). Todos os demais reagentes usados apresentaram o mais alto grau de pureza comercialmente disponível.

### **3.3 CARACTERIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DO CAFÉ**

Foi utilizado café da espécie *Coffea arabica*, torrado e moído, adquirido de estabelecimento de torrefação do Sul de Minas Gerais. A amostra utilizada foi do tipo exportação, grão sem defeito, granulação média e de processo de preparo natural de bebida mole. Segundo informações do fornecedor, os grãos foram torrados a 160 °C por aproximadamente 13 minutos, com classificação 45 ideal para consumo. A classificação dos pontos de torra foi realizada com auxílio de discos colorimétricos AGTRON/SCAA, de acordo com os padrões utilizados pela Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC, 2008).

Para a extração do café, um volume de 1000 mL de água destilada foi aquecido em chapa elétrica até 90 °C e vertido lentamente sobre 80 g do café moído. Após agitação por dois minutos, a suspensão foi colocada em banho a temperatura ambiente por 10 minutos. O extrato foi então centrifugado (Centrífuga Hitachi, Hitachinaka, Japão) a 27 x g por 10 minutos a 8 °C e o sobrenadante utilizado no preparo da dieta café.

### **3.4 PREPARO DAS DIETAS**

Para o preparo das dietas, as rações Labina® (Purina, SP, Brasil) e Kanina - Carne e ossinho® (Purina, SP, Brasil) foram previamente moídas (micro-moinho tipo Willye Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) e misturadas numa proporção de 4:1, respectivamente, de acordo com rotina do laboratório. A cada 90 g desta mistura foram adicionados 100 mL de uma solução, previamente dissolvida a quente (45 °C), contendo 4% de gelatina em pó, 1% de amido de milho e 5% de açúcar refinado. Depois de homogeneizada, a massa resultante foi cortada em pequenos pedaços e seca a 60 °C em estufa com circulação forçada de ar (Nova Ética, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil). Esta recebeu o nome de dieta controle.

A dieta café teve como base a dieta controle, sendo a água substituída por extrato aquoso de café 8% no preparo da solução contendo gelatina, amido e açúcar.

O preparo das dietas utilizando-se ração para cães teve como objetivo aproximar o teor lipídico da dieta oferecida aos animais experimentais do teor lipídico da AIN-93 e evitar maiores oscilações na composição de aminoácidos da dieta devido a possíveis variações na espécie de cereal utilizada na fabricação industrial da ração para biotério. A composição nutricional centesimal e o valor calórico das dietas são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição nutricional centesimal e valor calórico das dietas controle e café\*.

Macronutriente	Dieta controle	Dieta café
Carboidratos (g)	45,29	44,66
Proteína (g)	23,41	23,07
Lipídio (g)	4,23	4,16
Valor calórico (kcal/100g)	312,87	308,36

\*A composição nutricional foi calculada a partir da composição constante dos rótulos dos produtos comerciais utilizados, adicionada dos ingredientes utilizados para a preparação das dietas.

### 3.5 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal conforme projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo nº 172/07.

Foram utilizados no experimento ratos da raça Wistar da colônia do Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram acasalados e, constatada a prenhez, as fêmeas foram alocadas em gaiolas individuais, passando a receber dieta controle durante o período de gestação e lactação. O número de filhotes por fêmea foi fixado em oito. No desmame, aos 21 dias de vida, os filhotes machos foram alocados em gaiolas individuais e aleatoriamente separados em cinco grupos experimentais:

- **Controle *sham***: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e usados para a *sham* hepatectomia aos 63 dias de vida;
- **Controle *ad libitum***: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle;

- **Controle restrição alimentar:** grupo de animais alimentados com dieta controle, 70% da quantidade consumida pelo grupo Controle *sham*;
- **Café *ad libitum*:** grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta café;
- **Café restrição alimentar:** grupo de animais alimentados com dieta café, 70% da quantidade consumida pelo grupo Controle *sham*.

No 42º dia de vida, com exceção do grupo Controle *sham*, cada grupo de animal foi subdividido em dois novos grupos. No primeiro grupo, os animais foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese hepatócito resistente (HR), enquanto no segundo grupo os animais foram submetidos somente à hepatectomia parcial (HP). Dessa forma, o experimento passou a ser constituído por nove grupos de animais (Figura 1).

A indução da hepatocarcinogênese foi adaptada de SOLT & FARBER (1976) segundo SEMPLE-ROBERTS *et al.* (1987). A iniciação ocorreu no 42º dia de vida dos animais por injeção intraperitoneal de dose única de DEN 200 mg/kg de peso corporal em solução salina 0,9% (100 mg/mL). Dezesete dias após a iniciação, os animais receberam durante quatro dias consecutivos, via gavagem, 2-AAF na dosagem de 20 mg/kg de peso corporal dissolvido em 1,0 mL de propilenoglicol. No quinto dia, foi realizada HP de dois terços do órgão para estímulo mitogênico. Dois e quatro dias depois da realização da hepatectomia, dose adicional de 2-AAF (20 mg/kg de peso corporal) foi novamente administrada.

O controle da administração de DEN e 2-AAF foi realizado pela administração de 0,35 mL de solução salina 0,9% e de 1 mL de propilenoglicol, respectivamente. O protocolo de indução da hepatocarcinogênese é apresentado de forma esquemática na Figura 2.

O consumo de ração foi acompanhado diariamente. A quantidade de dieta a ser oferecida aos grupos de animais submetidos à restrição alimentar foi calculada a partir do consumo médio apresentado pelos animais do grupo Controle *sham*. O peso corporal foi acompanhado semanalmente. Todos os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina aos 84 dias de vida.

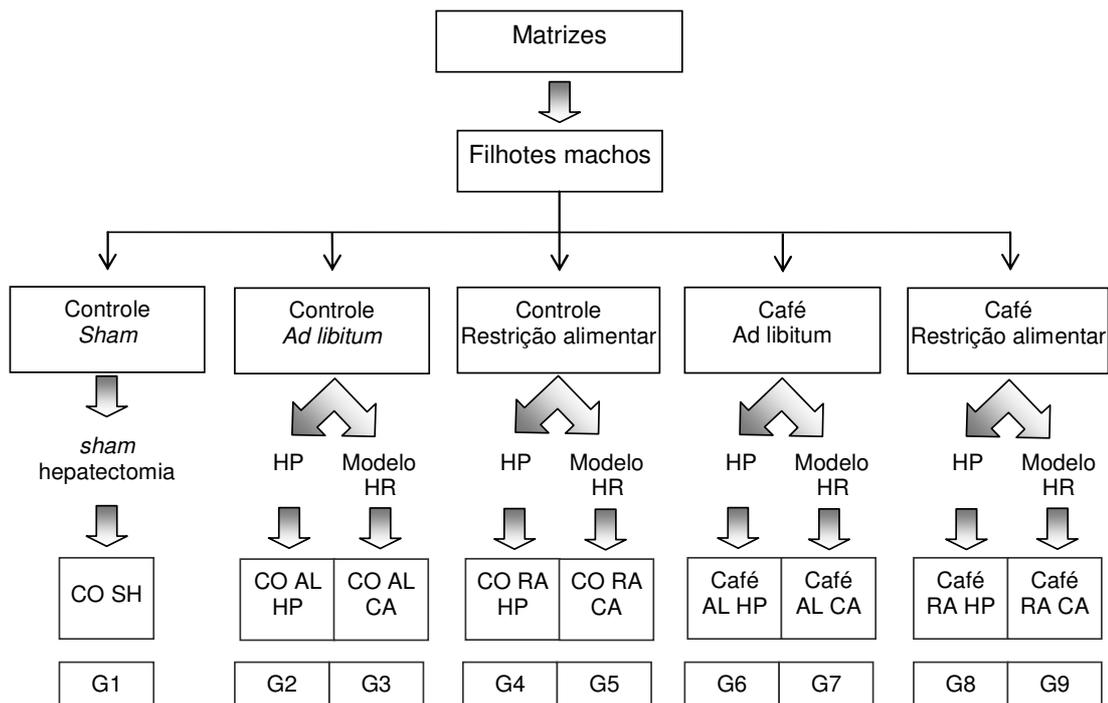


Figura 1 – Apresentação esquemática do desenho experimental. **CO SH**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos à *sham* hepatectomia; **CO AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos à hepatectomia parcial; **CO AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese; **CO RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial; **CO RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese; **Café AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos à hepatectomia parcial; **Café AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese; **Café RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial; **Café RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese.

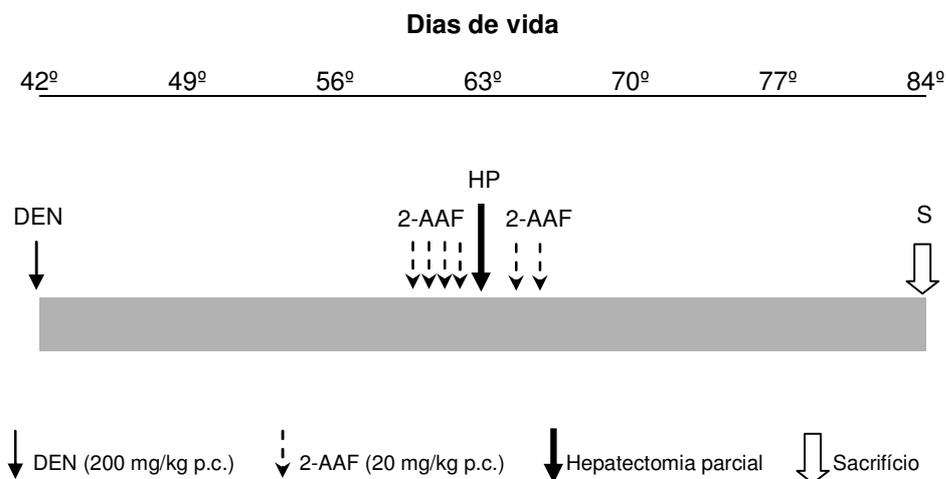


Figura 2 – Apresentação esquemática do protocolo de indução da hepatocarcinogênese. **DEN**: dietilnitrosamina; **2-AAF**: 2-acetilaminofluoreno.

### **3.6 HEPATECTOMIA PARCIAL E SHAM HEPATECTOMIA**

Os animais foram submetidos à HP ou à *sham* hepatectomia no 63º dia de vida, após serem anestesiados com solução contendo associação dos anestésicos de qualidade veterinária Ketamina e Xilasina nas doses de 57 mg/kg e 86 mg/kg, respectivamente.

A HP seguiu a metodologia de HIGGINS & ANDERSON (1931). Depois da remoção dos pêlos da região ventral e adequada assepsia local, foi realizada uma incisão na linha média alcançando três a quatro cm a partir do processo xifóide do esterno. Seccionaram-se as membranas que uniam os lobos médio e lateral esquerdo aos demais lobos. Após a exposição hepática, ligou-se a veia porta próximo à ramificação comum aos lobos médio e lateral esquerdo, utilizando-se fio de sutura estéril absorvível Catgut 4-0. Procedeu-se, então, a secção dos lobos médio e lateral esquerdo. Após a remoção dos lobos, a parede abdominal dos animais foi suturada em duas etapas: na primeira suturou-se a camada muscular e, na segunda, a pele. Foi utilizado fio de sutura estéril não absorvível de nylon monofilamento 4-0.

A *sham* hepatectomia consistiu em abertura da pele e da camada muscular. Após incisão na linha média alcançando três a quatro cm a partir do processo xifóide do esterno, foi realizada a sutura da parede abdominal dos animais usando-se fio de sutura estéril de nylon monofilamento 4-0.

No primeiro dia pós-operatório os animais receberam solução de sacarose 20% como fonte calórica. Após este período, foram oferecidas água e dieta normalmente.

### **3.7 REGENERAÇÃO HEPÁTICA**

Para avaliação da regeneração hepática, foram sacrificados 10 ratos da raça Wistar com 63 dias de vida e criados sob as mesmas condições ambientais que os animais do experimento.

No dia do sacrifício, estes animais foram pesados e, após decapitação em guilhotina, os fígados foram removidos, secados em papel filtro e pesados. Os lobos médio e lateral esquerdo foram então separados dos outros dois lobos e pesados. Utilizando o peso do animal, do fígado e dos lobos seccionados, foram calculadas duas constantes  $K_1$  e  $K_2$ , correspondendo à relação entre o peso do fígado e o peso dos lobos seccionados e à relação entre o peso do fígado e o peso corporal do animal, respectivamente. Os valores de  $K_1$  e  $K_2$  encontrados foram 1,5092 e 0,0368, respectivamente.

Com os valores das constantes  $K_1$  e  $K_2$ , do peso dos lobos seccionados e do peso dos animais na data da HP foi estimado o peso do fígado dos animais experimentais na data da hepatectomia e, assim, a regeneração hepática.

### **3.8 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS**

Após o sacrifício dos animais, os fígados foram removidos, secos em papel filtro e pesados. Um fragmento representativo do lobo lateral direito, no qual foi encontrado o maior número de lesões pré-neoplásicas (LPN) macroscopicamente visíveis, foi fixado em formalina tamponada 10% por aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente. Após fixação, os fragmentos foram processados rotineiramente para inclusão em parafina, que foi adequadamente armazenada para posterior confecção de cortes histológicos. O restante do fígado de cada animal foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento de preparar as amostras para as análises bioquímicas.

O preparo de microssomos foi realizado de acordo com KAMATH & RUBIN (1972). Um fragmento do fígado de cada animal foi retirado do freezer e homogeneizado a 25% (p/v) com solução de sacarose 0,25 M gelada. O homogeneizado foi centrifugado (Centrífuga Hitachi, Hitachinaka, Japão) a  $12.000 \times g$  por 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi transferido para outro tubo e novamente centrifugado a  $12.000 \times g$  por 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Parte do sobrenadante desta segunda centrifugação (sobrenadante pós-mitocondrial, SPM) foi distribuído em eppendorfs e armazenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O restante

do SPM foi diluído a 20% (v/v) em solução contendo sacarose 0,0125 M e CaCl<sub>2</sub> 8 mM (pH 7,5). Esta solução foi agitada por 1 minuto e então centrifugada a 30 x g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado, correspondendo à fração microsomal, foi homogeneizado em 6 mL de solução de sacarose 0,25 M, distribuído em eppendorfs e armazenado a -80 °C.

Para a determinação do conteúdo de GSH, um fragmento do fígado de cada animal foi homogeneizado a 2,5% (p/v) com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,02 M. Os homogeneizados foram preparados imediatamente antes da análise e mantidos em banho com gelo até o momento do uso.

### **3.9 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA**

Com os fragmentos hepáticos embebidos em parafina foram preparados cortes histológicos de 5 µm de espessura em lâminas silanizadas. Uma lâmina contendo cortes histológicos foi submetida à coloração de rotina para hematoxilina e eosina (HE), outra lâmina foi submetida à coloração de Shorr e uma terceira lâmina foi submetida à reação imunohistoquímica para PCNA, de acordo com o método descrito por HSU *et al.* (1981).

Os cortes histológicos corados em HE e Shorr foram usados para a visualização e morformetria das LPN, de acordo com a alteração da arquitetura hepática e diferenças na coloração dos hepatócitos que constituíam as lesões, comparados aos do parênquima normal adjacente.

Em cada lâmina, corada em Shorr e corada em HE, todos os cortes histológicos foram examinados em toda sua extensão usando-se microscópio ótico binocular (Olympus Optical do Brasil, modelo BX41, São Paulo, SP, Brasil), procurando-se focos ou nódulos com alteração na arquitetura hepática e na coloração dos hepatócitos. As imagens das LPN foram capturadas somente após a confirmação da reprodutibilidade da lesão, simultaneamente, na lâmina corada em Shorr e na lâmina corada em HE, bem como em todos os cortes de uma mesma lâmina, evitando-se, portanto, a captura de imagens de possíveis artefatos de coloração.

A coloração de Shorr foi utilizada também para identificação de células apoptóticas, conforme descrito por SANTOS *et al.* (2008). A coloração de Shorr permite rápida visualização da retração celular, da condensação da cromatina e da fragmentação nuclear e celular, típicas desse tipo de morte celular.

Para a reação imunohistoquímica para PCNA, as lâminas foram desparafinizadas, reidratadas e mantidas em tampão citrato (pH 6,0) por 30 minutos a 85 °C. Para bloqueio de ligação de proteína não específica, depois de resfriadas, as lâminas foram imersas em leite em pó desnatado 1% preparado em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,3) por 60 minutos a 4 °C. Em seguida, as lâminas foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpo primário de camundongo anti-PCNA diluído a 1:100 em albumina de soro bovino 1%. No dia seguinte, as lâminas foram incubadas por 60 minutos em temperatura ambiente com anticorpo secundário biotilado anti-IgG de camundongo diluído a 1:100 em albumina de soro bovino 1%. Para bloqueio da peroxidase endógena, foi então aplicado peróxido de hidrogênio 3% em metanol por 30 minutos. As lâminas foram então incubadas por 45 minutos com o complexo avidina-biotina Vectastain Elite diluído a 1:50 em PBS. Após cada etapa da reação, as lâminas foram lavadas em três banhos de cinco minutos em PBS, exceto depois da imersão em leite em pó desnatado.

Para a subsequente visualização das estruturas imunoreativas, as lâminas foram incubadas por dois minutos à temperatura ambiente em cromógeno DAB diluído a 1:100. Finalmente, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, clarificadas em xilol e montadas com resina sintética.

As imagens dos cortes histológicos, corados por Shorr, HE ou submetidos à reação imuno-histoquímica para PCNA, foram capturadas usando-se câmera digital Sony (Tóquio, Japão) acoplada a microscópio ótico binocular (Olympus Optical do Brasil, modelo BX41, São Paulo, SP, Brasil).

A partir da imagem capturada, foram realizadas análises morfológica e morfométrica das LPN e a avaliação da apoptose e da proliferação celular utilizando-se o programa Image-Pro Plus (Bethesda, MD, EUA).

A apoptose e a proliferação celular foram determinadas nos animais submetidos ao modelo HR pela avaliação aleatória de 6 a 8 campos histológicos,

totalizando, no mínimo, 2.000 hepatócitos que constituíam as LPN. Segundo KOLAJA *et al.* (1996), os hepatócitos que constituem as LPN são mais sensíveis ao efeito de moduladores sobre a proliferação celular e a apoptose, quando comparados aos hepatócitos normais.

Na análise morfométrica das LPN, os dados foram expressos em número e área por cm<sup>2</sup> de corte histológico. Os valores de apoptose foram expressos pelo índice de apoptose, que corresponde à relação entre o número de hepatócitos em apoptose e o número total de hepatócitos analisados. A proliferação celular foi expressa pelo índice de marcação pelo PCNA, que corresponde à relação entre o número de hepatócitos PCNA positivos e o número total de hepatócitos analisados.

### **3.10 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA**

O teor de proteína foi determinado no SPM e na fração microsomal pelo método de LOWRY *et al.* (1951), modificado por HARTREE (1972), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. Inicialmente, as amostras foram retiradas do freezer, descongeladas sob refrigeração e diluídas em solução salina 0,9% na proporção de 1:100 e 1:20 para SPM e microsomos, respectivamente. Das amostras diluídas, 100 µL foram colocados em tubos de ensaio identificados em duplicata, sendo adicionados 900 µL de água destilada. A cada tubo foi adicionado um volume de 900 µL de solução de tartarato de sódio e potássio 0,2%, carbonato de sódio 10% e NaOH 0,5 N, seguido de incubação por 10 minutos em banho a 50 °C (Banho Yamato, modelo BT-25, Tóquio, Japão). Após atingir temperatura ambiente, foi adicionado a cada tubo 100 µL de solução de tartarato de sódio e potássio 2%, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 1% e NaOH 0,1 N. Os tubos foram mantidos em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo então adicionados 3,0 mL da solução aquosa de Folin-Ciocalteu 2 N (1:15 v/v), seguindo-se novamente incubação por 10 minutos em banho a 50 °C. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Hitachi, Hitachinaka, Japão) a 650 nm de comprimento de onda.

Este método consiste na reação da proteína com o cobre em condições alcalinas, seguida da redução dos ácidos fosfotungstênico e fosfomolibdênico em

tungstênio e molibdênio, respectivamente. Estes possuem coloração azul e apresentam resposta fotométrica linear (LOWRY *et al.*, 1951).

### **3.11 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA**

A peroxidação lipídica foi avaliada no sobrenadante pós-mitocondrial a partir da determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com o método proposto por BUEGE & AUST (1978). Esse método se baseia na reação dos produtos finais da peroxidação lipídica, como malondialdeído (MDA), peróxidos lipídicos e demais aldeídos de baixo peso molecular, com o TBA, formando bases de Schiff. Tais complexos conferem cor avermelhada à solução e permitem leitura espectrofotométrica a 535 nm (YAGI, 1984).

Inicialmente, os SPMs foram retirados do freezer, descongelados sob refrigeração e diluídos em água destilada na proporção de 1:10. Em tubos de ensaio identificados em duplicata foram adicionados 500 µL de SPM diluído 1:10 e 2,0 mL de solução de ácido tricloroacético 15% (p/v), TBA 0,375% e ácido clorídrico 0,25 N. A mistura foi homogeneizada, seguindo-se incubação em banho-maria a 100 °C por 15 minutos. Após ser resfriada em temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada (Centrífuga Hitachi, modelo CR-21, Hitachinaka, Japão) a 1.000 x g por 10 minutos para separação da proteína precipitada. A leitura do sobrenadante foi feita em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2100, Hitachinaka, Japão) a 535 nm, contra um branco contendo 500 µL de água destilada e 2,0 mL da solução de ácidos descrita acima.

A concentração de TBARS foi calculada usando-se o coeficiente de extinção molar do MDA de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , conforme descrito por BUEGE & AUST (1978). Os resultados foram expressos em nmoles de TBARS por mg de proteína.

### **3.12 DETERMINAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA**

O conteúdo hepático de glutatona reduzida (GSH) foi estimado a partir da determinação dos grupos sulfidrílicos não proteicos, segundo o método descrito por SEDLAK & LINDSAY (1968), com modificações. Em tubos de ensaio identificados em duplicata, alíquotas de 2,5 mL de homogeneizado foram misturadas com 2,0 mL de água destilada e 0,5 mL de ácido tricloroacético 50%. Após homogeneização em vórtex, a mistura foi mantida em repouso, com agitação ocasional, por 15 minutos, sendo centrifugada (Centrífuga Hitachi, modelo CR-21, Hitachinaka, Japão) a 4.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. A 1,0 mL do sobrenadante foram misturados 2,0 mL de solução de Tris-HCl 0,4 M (pH 8,9) + EDTA 0,02 M e 50 µL de DTNB 0,01 M. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2100, Hitachinaka, Japão) a 412 nm dentro de 5 minutos após a adição de DTNB, contra um branco contendo 1,0 mL de EDTA 0,02 M em substituição à amostra.

Esta técnica baseia-se na redução do DTNB por grupos tióis, produzindo o ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico, composto com intensa cor amarela que absorve a luz a 412 nm e pode ser usado para quantificar grupos sulfidrílicos presentes na amostra (SEDLAK & LINDSAY, 1968).

A determinação do conteúdo de GSH foi realizada comparativamente utilizando-se curva padrão obtida sob as mesmas condições experimentais e com diferentes concentrações de GSH. Os resultados foram expressos em nmoles de GSH por mg de proteína.

### **3.13 ATIVIDADE DA URIDINA DIFOSFATO GLICURONOSILTRANSFERASE**

A atividade da uridina difosfato glicuronosiltransferase (UDPGT) foi determinada na fração microsomal hepática dos ratos, de acordo com BOCK *et al.* (1983). O método baseia-se na reação de glicuronidação do *p*-nitrofenol, produzindo o glicuronato de *p*-nitrofenol. O *p*-nitrofenol não conjugado pode ser quantificado por espectrofotometria a 405 nm (MANHÃES-ROCHA, 2004).

Em tubos de ensaio identificados em triplicata foi adicionada uma mistura contendo: 100 µL de microsomos, 50 µL de Tris-HCl 1 M (pH 7,4), 50 µL de Brij 58 0,5%, 50 µL de *p*-nitrofenol 5 mM, 50 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM e 150 µL de água

bidestilada. Após dois minutos de pré-incubação em banho a 37 °C (Banho Yamato, modelo BT-25, Tóquio, Japão), a reação foi iniciada pela adição de 50 µL de ácido UDP-glicurônico 30 mM.

Além dos tubos em triplicata para cada amostra e para preparo do branco, um tubo de “referência” também foi incluído para a reação. O branco e a “referência” continham todos os componentes para a reação, exceto o *p*-nitrofenol e o ácido UDP-glicurônico, respectivamente. Ambos não receberam amostra.

Todos os tubos foram mantidos em banho a 37 °C por 10 minutos. Transcorridos este tempo de reação, 100 µL da mistura de incubação foram transferidos para tubos contendo 1,0 ml de ácido tricloroacético 5% para interromper a reação. Esta mistura foi então centrifugada (Centrífuga Hitachi, modelo CR-21, Hitachinaka, Japão) a 2.500 rpm por 20 minutos a 4 °C. Diretamente em cubeta de vidro, 200 µL de NaOH 2 N foi adicionado a 800 µL do sobrenadante. Após homogeneização da mistura por inversão da cubeta, a absorbância foi lida a 405 nm em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2100, Hitachinaka, Japão).

A absorbância da amostra e da “referência” foi lida contra o branco. Estas resultam da absorção da luz pelo *p*-nitrofenol não conjugado. Dessa forma, o valor diferencial entre a absorbância da referência e a das amostras corresponde ao glicuronato de *p*-nitrofenol formado (MANHÃES-ROCHA, 2004).

A concentração do glicuronato de *p*-nitrofenol formado foi calculada usando-se o coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol de  $14,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  descrito por MARTIN & BLACK (1994). A atividade da enzima foi expressa em nmoles de glicuronato de *p*-nitrofenol por minuto por mg de proteína.

### **3.14 ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE**

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi avaliada no SPM, segundo HABIG *et al.* (1974). O procedimento consistiu na adição de 50 µL de SPM diluído 1:10 em salina 0,9% a 805 µL de tampão fosfato 0,1 M + EDTA 1 mM (pH 6,5), 15 µL de GSH 60 mM e, por último, 30 µL de CDNB 30 mM. O branco da reação foi preparado substituindo-se a amostra por volume equivalente de água destilada.

A absorbância foi registrada 30 segundos após adição do CDNB à solução de leitura. As análises foram feitas em triplicata e as leituras registradas em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2001, Hitachinaka, Japão) utilizando o comprimento de onda de 345 nm.

Os valores de absorbância da amostra foram previamente subtraídos dos valores de absorbância para a reação espontânea (branco).

A concentração do produto formado foi calculada usando-se o coeficiente de extinção molar do CDNB, nas condições do experimento, de  $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , (HABIG *et al.*, 1974). A atividade da enzima foi expressa em nmoles de 1-glutatiol 2,4-dinitrobenzeno por minuto por mg de proteína.

### **3.15 ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE**

A avaliação da atividade da glutatona redutase (GR) foi realizada segundo CARLBERG & MANNERVIK (1975). Em tubos de ensaio identificados em triplicata foi adicionada uma mistura contendo: 500  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 0,1 M + EDTA 0,5 mM (pH 7,6), 50  $\mu\text{L}$  de GSSG 14 mM, 50  $\mu\text{L}$  de NADPH 1,4 mM e, por último, 100  $\mu\text{L}$  de SPM.

A leitura foi registrada em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2001, Hitachinaka, Japão) a 340 nm em intervalos de 10 segundos, iniciando 30 segundos após adição da amostra.

A unidade de atividade enzimática foi definida como a oxidação de 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto por mg de proteína e foi calculado com base na absortividade molar do NADPH a 340 nm, de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (PAGLIA & VALENTINE, 1967).

### **3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS**

Foi realizado o teste de normalidade de Filliben para todas as variáveis do estudo para a indicação do teste estatístico mais adequado. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal sobre a Curva de Gauss foi utilizada análise de

variância e discriminação das médias pelo teste de Duncan. Para as demais se utilizou o teste de Kruskal-Wallis seguido de discriminação das médias pelo teste de Dunn-Bonferroni.

Estabeleceu-se como nível de rejeição para a hipótese de nulidade  $p < 0,05$ . Os resultados das análises paramétricas foram apresentados como média e erro padrão da média (EPM), enquanto os das análises não paramétricas foram apresentados como mediana e amplitude.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CONSUMO DE RAÇÃO E PESO CORPORAL

O consumo de ração pelos grupos de animais alimentados *ad libitum* da 4ª a 6ª semana de vida está representado na Figura 3. Neste período, não foi encontrada diferença significativa no consumo de ração entre os grupos de animais.

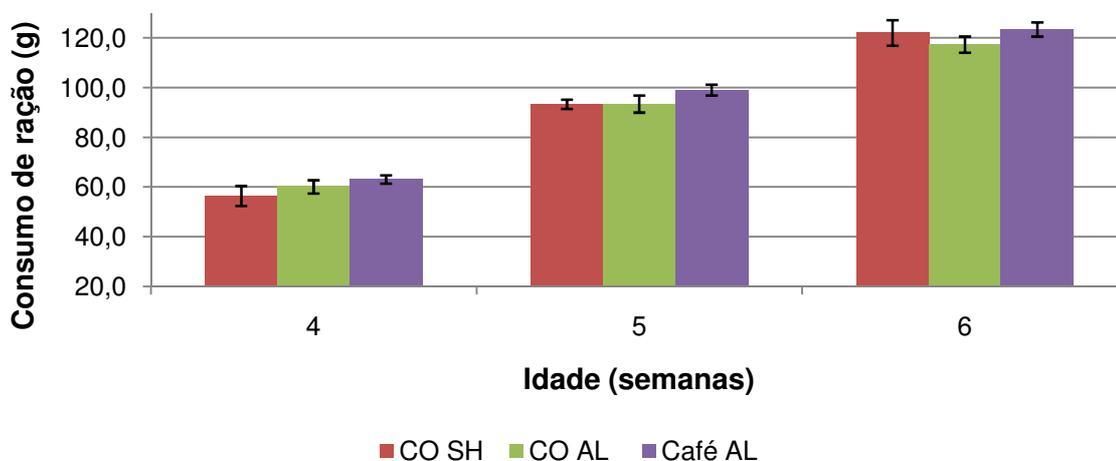


Figura 3 – Consumo de ração semanal da 4ª a 6ª semana de vida. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. **CO SH**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle submetidos posteriormente à *sham* hepatectomia ( $n=8$ ); **CO AL**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle; foi subdividido posteriormente em grupo submetido à hepatectomia parcial e grupo submetido ao modelo de hepatocarcinogênese ( $n=22$ ); **Café AL**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café; foi subdividido posteriormente em grupo submetido à hepatectomia parcial e grupo submetido ao modelo de hepatocarcinogênese ( $n=22$ ). Não foi observada diferença significativa no consumo de ração entre os grupos no período ( $p<0,05$ ).

O consumo de ração pelos animais alimentados *ad libitum* da 7ª a 12ª semana de vida está representado na Figura 4. Entre os animais submetidos somente à hepatectomia parcial (HP), não foi encontrada diferença no consumo de ração entre aqueles alimentados com dieta controle (G2) ou dieta café (G6). Comparado ao grupo Controle *sham* (G1), estes dois grupos de animais (G2 e G6) apresentaram redução significativa no consumo de ração nas semanas 9 e 10, período que incluiu a realização da hepatectomia e a recuperação dos animais.

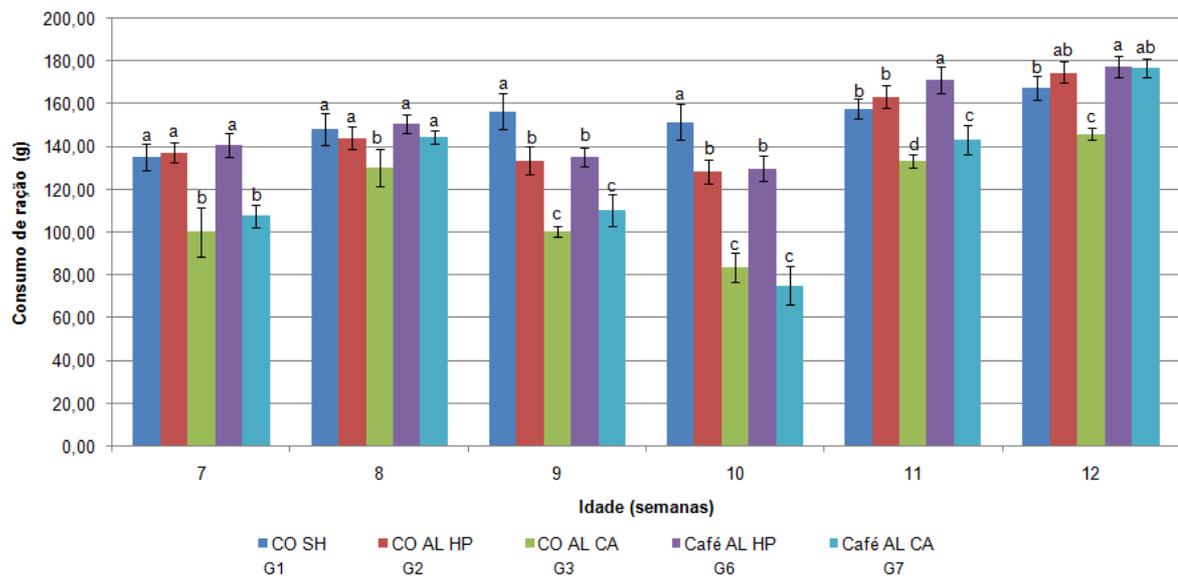


Figura 4 – Consumo de ração semanal da 7<sup>a</sup> a 12<sup>a</sup> semana de vida. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. **CO SH**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos à *sham* hepatectomia (**n=8**); **CO AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos à hepatectomia parcial (**n=8**); **CO AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (**n=9**); **Café AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos à hepatectomia parcial (**n=8**); **Café AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (**n=11**). Nas semanas 7 e 9 os animais foram submetidos à iniciação e à promoção da carcinogênese, respectivamente. Letras distintas no mesmo período indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Comparados aos animais submetidos somente à HP (G2 e G6), aqueles submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (G3 e G7) apresentaram redução no consumo de dieta da 7<sup>a</sup> a 12<sup>a</sup> semana de vida, sendo o efeito significativamente menor nos animais alimentados com dieta café (G7) nas semanas 8, 11 e 12. Neste grupo de animais (G7) o consumo de ração na 12<sup>a</sup> semana de vida igualou-se ao consumo apresentado pelos animais do grupo Controle *sham* (G1).

Nas Figuras 5 e 6 está representado o peso corporal dos grupos de animais do 21<sup>o</sup> ao 35<sup>o</sup> dia e do 42<sup>o</sup> ao 84<sup>o</sup> dia de vida, respectivamente. O peso dos animais não diferiu entre os grupos aos 21 dias de vida. A partir do 28<sup>o</sup> dia de vida foi observada redução significativa no peso dos animais submetidos à restrição alimentar, tanto nos alimentados com dieta café quanto nos que receberam dieta controle, quando comparados ao grupo Controle *sham*. Esta redução do peso corporal persistiu ao longo do experimento.

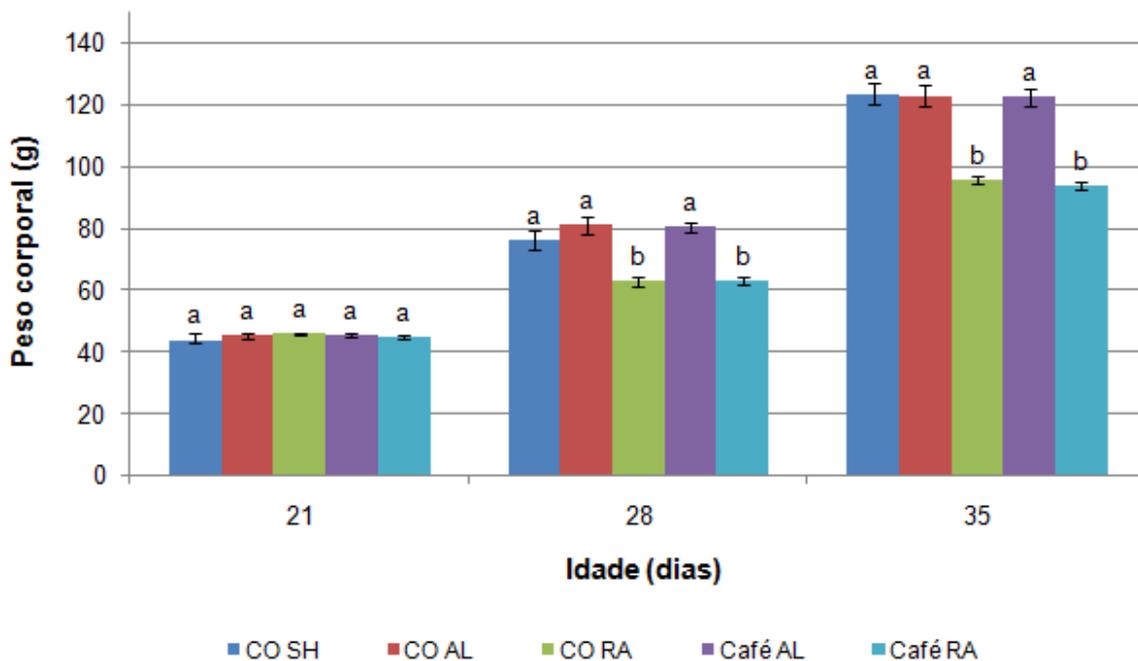


Figura 5 – Peso corporal do 21º ao 35º dia de vida. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. **CO SH**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle submetidos posteriormente à *sham* hepatectomia (n=8); **CO AL**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle; foi subdividido posteriormente em grupo submetido à hepatectomia parcial e grupo submetido ao modelo de hepatocarcinogênese (n=22); **Café AL**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café; foi subdividido posteriormente em grupo submetido à hepatectomia parcial e grupo submetido ao modelo de hepatocarcinogênese (n=22). Letras sobrescritas distintas no mesmo período indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Os animais alimentados *ad libitum* e submetidos à indução da carcinogênese hepática, tanto os que receberam dieta controle (G3) quanto os que receberam dieta café (G7), apresentaram redução significativa no peso corporal do 49º ao 84º dia, quando comparados ao respectivo controle (G2 e G6). A redução no peso corporal foi menos acentuada nos dias 49º, 56º e 63º nos animais que receberam *ad libitum* ração adicionada de café (G7).

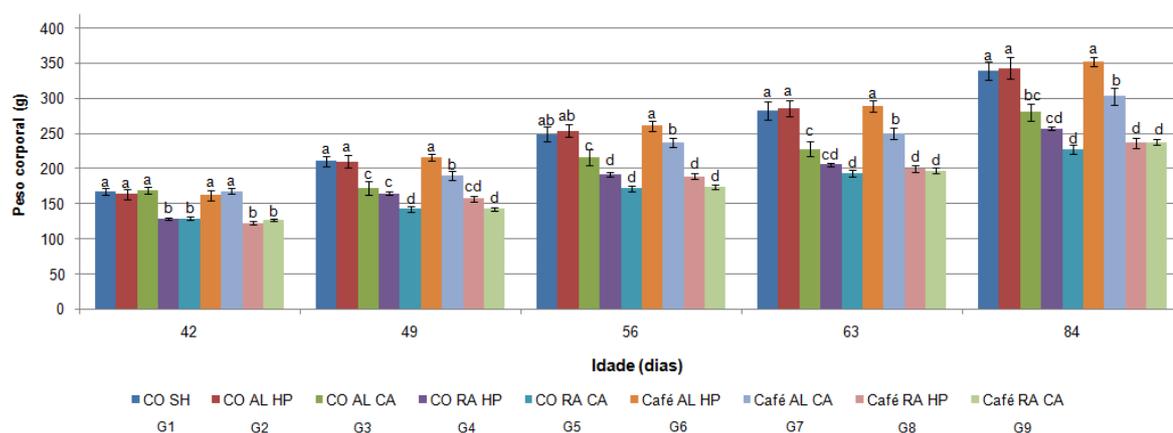


Figura 6 – Peso corporal do 42º ao 84º dia de vida. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. **CO SH**: grupo de animais alimentados com dieta controle e submetidos à *sham* hepatectomia (n=8); **CO AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos à hepatectomia parcial (n=8); **CO AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (n=9); **CO RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial (n=8); **CO RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese (n=9); **Café AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos à hepatectomia parcial (n=8); **Café AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (n=11); **Café RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial (n=6); **Café RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese (n=11). No 42º e do 59º ao 67º dia de vida os animais foram submetidos à iniciação e à promoção da carcinogênese, respectivamente. Letras sobrescritas distintas no mesmo período indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

## 4.2 PESO DO FÍGADO E REGENERAÇÃO HEPÁTICA

Na Tabela 2 são apresentados os valores do peso estimado do fígado na data da HP, aos 63 dias de vida, o peso do fígado na data do sacrifício, aos 84 dias de vida, e o percentual de recuperação da massa hepática pós-HP, incluindo o ganho de peso hepático devido ao crescimento do animal. Não foi encontrada diferença no percentual de regeneração hepática entre os grupos de animais.

Os animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos à indução da hepatocarcinogênese (G3) apresentaram redução significativa no peso do fígado na data da hepatectomia, quando comparados àqueles que receberam *ad libitum* a mesma dieta e foram submetidos somente à HP (G2).

Entre os animais que receberam *ad libitum* dieta café, aqueles submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (G7) apresentaram redução significativa no peso do fígado na data do sacrifício, quando comparados àqueles submetidos somente à HP (G6)

No grupo de animais alimentados *ad libitum* e submetidos à HP, foi observado aumento significativo no peso do fígado regenerado entre aqueles que receberam dieta café (G6), quando comparados àqueles que receberam dieta controle (G2). Da mesma forma, na data da hepatectomia foi observado aumento no peso do fígado dos animais alimentados *ad libitum* com dieta café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (G7), quando comparados aos animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos ao mesmo modelo (G3).

Tabela 2 – Peso do fígado (gramas) e percentual de regeneração hepática.

Grupos <sup>1</sup>	Nº de animais	Peso do fígado na data da HP <sup>2</sup>	Peso do fígado na data do sacrifício	% regeneração <sup>3</sup>
CO AL HP (G2)	8	10,90 ± 0,43 <sup>a</sup>	12,24 ± 0,55 <sup>b</sup>	112,30 ± 3,25 <sup>a</sup>
CO AL CA (G3)	9	9,34 ± 0,43 <sup>b</sup>	11,41 ± 0,45 <sup>b</sup>	125,27 ± 2,94 <sup>a</sup>
CO RA HP (G4)	8	7,36 ± 0,12 <sup>c</sup>	8,47 ± 0,24 <sup>c</sup>	115,41 ± 4,07 <sup>a</sup>
CO RA CA (G5)	9	7,33 ± 0,21 <sup>c</sup>	8,27 ± 0,22 <sup>c</sup>	113,52 ± 4,18 <sup>a</sup>
Café AL HP (G6)	8	11,77 ± 0,44 <sup>a</sup>	13,47 ± 0,51 <sup>a</sup>	115,22 ± 5,01 <sup>a</sup>
Café AL CA (G7)	11	10,85 ± 0,48 <sup>a</sup>	12,27 ± 0,37 <sup>b</sup>	113,77 ± 2,03 <sup>a</sup>
Café RA HP (G8)	6	7,27 ± 0,22 <sup>c</sup>	7,99 ± 0,32 <sup>c</sup>	110,19 ± 4,96 <sup>a</sup>
Café RA CA (G9)	11	7,53 ± 0,19 <sup>c</sup>	7,96 ± 0,30 <sup>c</sup>	106,08 ± 3,82 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>**CO AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos à hepatectomia parcial; **CO AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese; **CO RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial; **CO RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese; **Café AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos à hepatectomia parcial; **Café AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese; **Café RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial; **Café RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese. <sup>2</sup>Peso do fígado na data da hepatectomia parcial (HP), aos 63 dias de vida, estimado a partir do peso corporal animal e peso dos lobos seccionados. <sup>3</sup>Recuperação da massa hepática da data da HP, aos 63 dias de vida, até a data do sacrifício, aos 84 dias de vida. Os valores estão expressos como média ± EPM. Letras sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan (p<0,05).

Os animais submetidos à restrição alimentar apresentaram redução significativa no peso do fígado na data da hepatectomia e no peso do fígado regenerado. Esta redução foi observada tanto nos animais alimentados com dieta café quanto naqueles alimentados com dieta controle, submetidos à HP ou à indução da hepatocarcinogênese.

No grupo de animais submetidos à sham hepatectomia, o peso do fígado apresentado na data do sacrifício foi de  $12,59 \pm 0,50$  g. Considerando-se o peso hepático na data da hepatectomia de  $10,40 \pm 0,46$  g, estimado a partir do peso corporal, o peso médio do fígado na data do sacrifício corresponderia  $120,00 \pm 5,14\%$  do peso hepático desses animais na data da hepatectomia.

### 4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

#### 4.3.1 Análise macroscópica

Não foram observadas lesões pré-neoplásicas (LPN) no fígado dos animais submetidos à *sham* hepatectomia ou à HP. Por outro lado, os animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese apresentam lesões com variação no número, tamanho e intensidade de coloração (Figura 7).



Figura 7 – Fotografia de fígado de rato da raça Wistar submetido ao modelo hepatócito resistente.

### 4.3.2 Análise microscópica

Nos cortes histológicos, corados em (hematoxilina e eosina) HE, dos animais submetidos somente à HP não foi observada qualquer alteração da arquitetura hepática ou a presença de LPN, confirmando a análise macroscópica.

Por outro lado, os cortes histológicos dos animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese HR mostraram alteração parcial da arquitetura hepática devido à presença de nódulos. Estes se apresentavam geralmente de forma esférica, de número e tamanhos variados e, algumas vezes, demarcados do parênquima adjacente por finas traves de tecido conjuntivo. Os hepatócitos que constituíam estas lesões apresentavam-se com intensidade de coloração variada, ora eosinofílica ora basofílica. Exibiam tamanhos variados, com núcleos grandes, vesiculares e com nucléolo aumentado. Os sinusóides, no interior dos nódulos, por vezes encontravam-se comprimidos pelos hepatócitos aumentados. A superfície total de corte histológico examinada foi  $0,80 \pm 0,03 \text{ cm}^2$ . Nas figuras 8 e 9 são apresentadas fotomicrografias de cortes histológicos de fígado corados em HE e por Shorr, respectivamente.

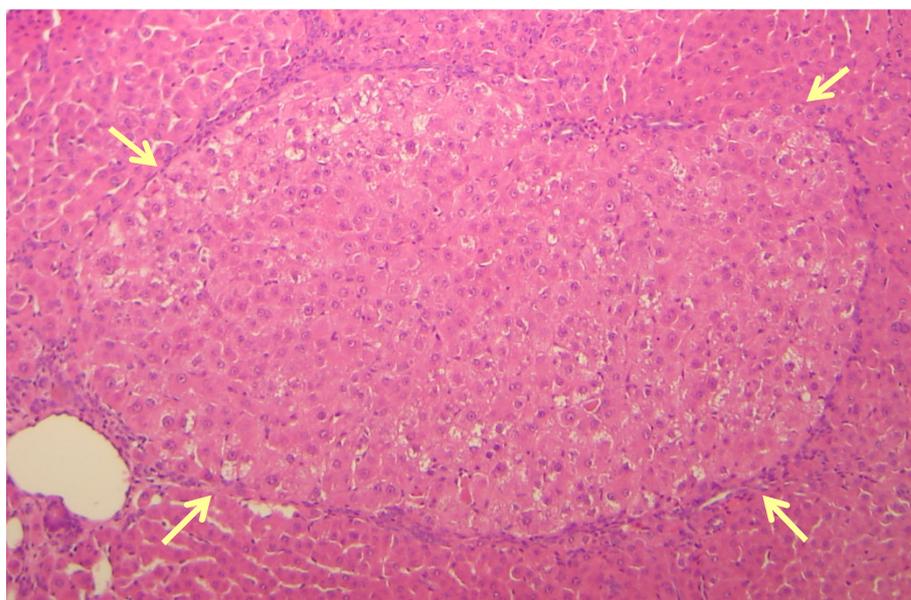


Figura 8 – Fotomicrografia de corte histológico de fígado corado em hematoxilina e eosina de animal submetido ao modelo hepatócito resistente. Setas indicam a delimitação da lesão. Observar alteração na arquitetura hepática e na coloração dos hepatócitos que constituem a lesão, comparados aos do parênquima adjacente (objetiva de 10x).

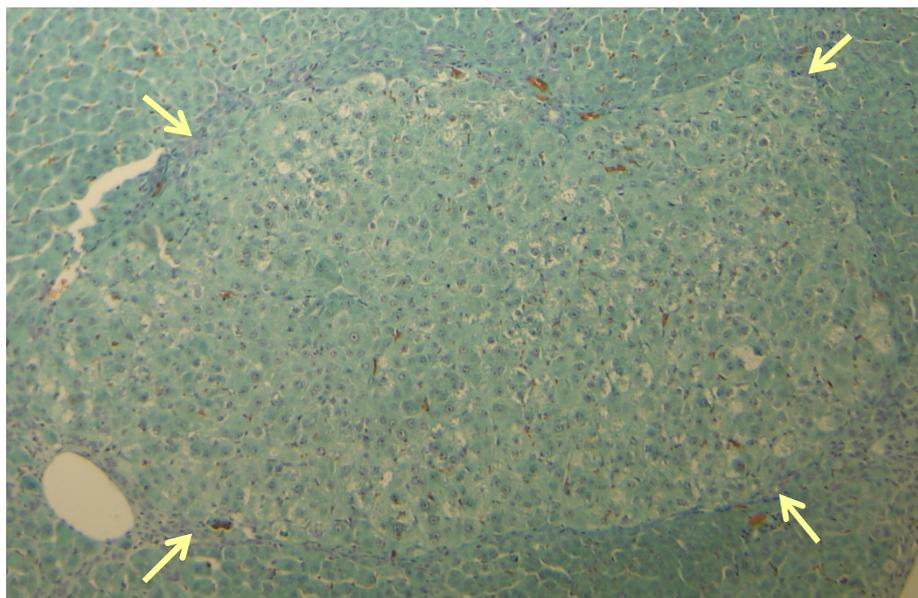


Figura 9 – Fotomicrografia de corte histológico de fígado corado por Shorr de animal submetido ao modelo hepatócito resistente. Setas indicam a delimitação da lesão. Observar alteração na arquitetura hepática e na coloração dos hepatócitos que constituem a lesão, comparados aos do parênquima normal adjacente (objetiva de 10x).

#### 4.3.3 Análise morfométrica

Os dados morfométricos das LPN observadas em cortes histológicos corados em HE e por Shorr de animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese HR são apresentados na Tabela 3. Os animais alimentados *ad libitum* com dieta café (G7) apresentaram redução significativa no número de LPN e na área ocupada pelas LPN no parênquima hepático, correspondendo, respectivamente, a 28,3% e 22,7% dos valores médios encontrados para os animais alimentados *ad libitum* com dieta controle (G3). A adição de café à dieta também resultou na redução da área ocupada pelas LPN nos animais submetidos à restrição alimentar (G9) em 85,5%, quando comparados aos animais submetidos à restrição alimentar que receberam dieta controle (G5).

Os animais submetidos à restrição alimentar (G5 e G9) não apresentaram alteração no número ou tamanho das LPN quando comparados aos respectivos controles (G3 e G7).

Tabela 3 – Morfometria de lesões pré-neoplásicas (LPN) em cortes histológicos hepáticos dos grupos de animais submetidos ao modelo hepatócito resistente.

Grupos <sup>1</sup>	Nº animais	Nº LPN / cm <sup>2</sup>	% Área lesão / área tecido
CO AL CA (G3)	9	21,21 (6,54; 94,14) <sup>a</sup>	6,62 (1,97; 37,69) <sup>a</sup>
CO RA CA (G5)	8	15,76 (8,90; 36,77) <sup>ab</sup>	5,71 (2,97; 17,57) <sup>ab</sup>
Café AL CA (G7)	11	8,09 (1,30; 20,36) <sup>b</sup>	1,43 (0,28; 10,74) <sup>bc</sup>
Café RA CA (G9)	11	6,25 (2,19; 24,58) <sup>b</sup>	0,56 (0,14; 3,31) <sup>c</sup>

<sup>1</sup>**CO AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese; **CO RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese; **Café AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese; **Café RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese. Os valores estão expressos como mediana e amplitude. Letras sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn-Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

Nas figuras 10 e 11 são apresentadas fotomicrografias de cortes histológicos do fígado corados por Shorr e por técnica imunohistoquímica para PCNA, mostrando, respectivamente, hepatócitos em apoptose e hepatócitos em proliferação.

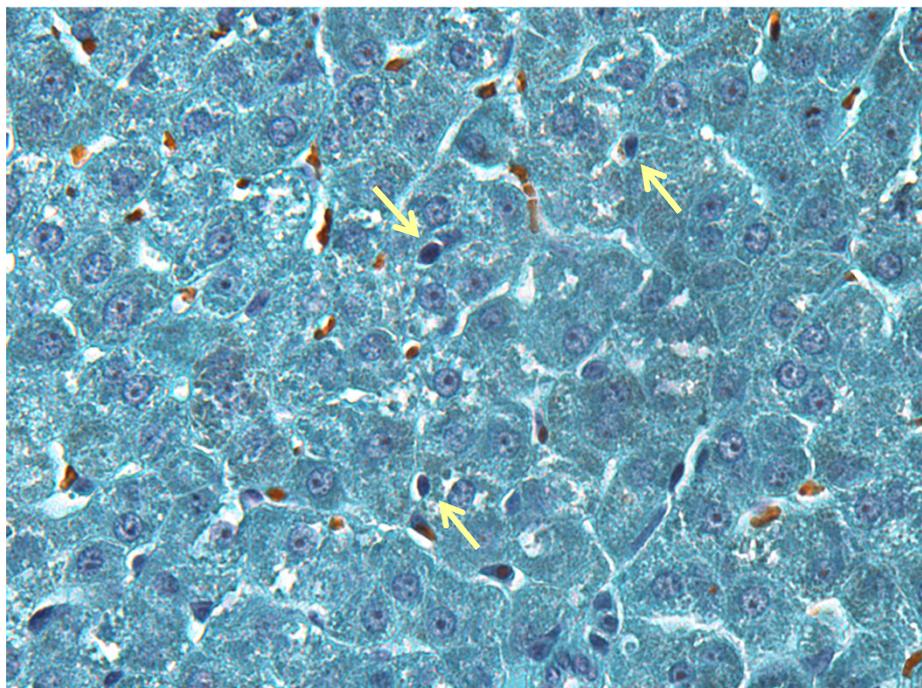


Figura 10 – Fotomicrografia de corte histológico de fígado corado por Shorr mostrando hepatócitos em apoptose (indicado pelas setas; objetiva de 40x).

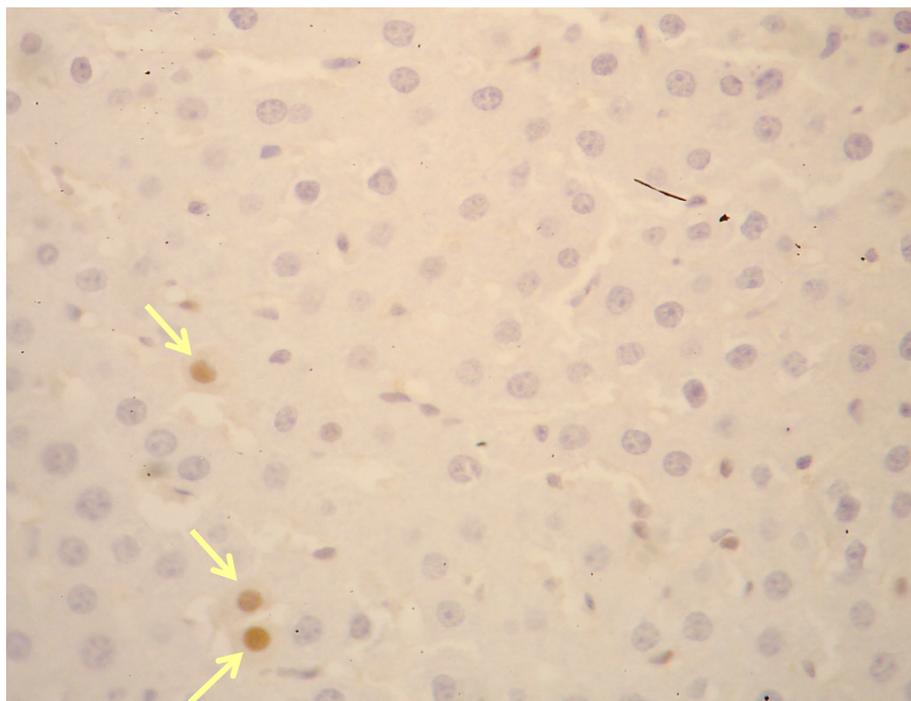


Figura 11 – Fotomicrografia de corte histológico de fígado submetido à reação imunohistoquímica para PCNA mostrando hepatócitos em proliferação (indicado pelas setas; objetiva de 40x).

Nas tabelas 4 e 5 estão apresentados, respectivamente, os índices de apoptose e de proliferação celular dos animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese HR.

Tabela 4 – Índice de apoptose hepática dos grupos de animais submetidos ao modelo hepatócito resistente.

Grupos <sup>1</sup>	Nº animais	Índice de apoptose (%)
CO AL CA (G3)	9	1,71 ± 0,12
CO RA CA (G5)	9	1,76 ± 0,09
Café AL CA (G7)	11	1,51 ± 0,09
Café RA CA (G9)	7	1,59 ± 0,11

<sup>1</sup>**CO AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese; **CO RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese; **Café AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese; **Café RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese. Os valores estão expressos como média ± EPM. Não foi observada diferença significativa no índice de apoptose entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Não foi encontrada diferença significativa no índice de apoptose entre os grupos de animais. Por outro lado, a proliferação celular foi diminuída significativamente nos grupos que receberam dieta suplementada com extrato de café. A redução foi observada tanto no grupo de animais alimentados *ad libitum* (G7) quanto naqueles submetidos à restrição alimentar (G9), correspondendo a 42,1% e 44,6% dos valores encontrados para os respectivos controles (G3 e G5).

Tabela 5 – Índice de proliferação celular hepático dos grupos de animais submetidos ao modelo hepatócito resistente.

Grupos <sup>1</sup>	Nº animais	Índice de proliferação (%)
CO AL CA (G3)	8	9,13 ± 1,04 <sup>a</sup>
CO RA CA (G5)	9	8,93 ± 1,00 <sup>a</sup>
Café AL CA (G7)	11	5,29 ± 0,60 <sup>b</sup>
Café RA CA (G9)	6	4,95 ± 1,06 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>**CO AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese; **CO RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese; **Café AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese; **Café RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese. Os valores estão expressos como média ± EPM. Letras sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4 CONTEÚDO DE PROTEÍNA

Na Figura 12 estão representados os valores do conteúdo hepático de proteína dos animais experimentais, cujos valores variaram de 114,89 a 140,71 mg/g de amostra. Não foi encontrada diferença estatística entre os diferentes grupos.

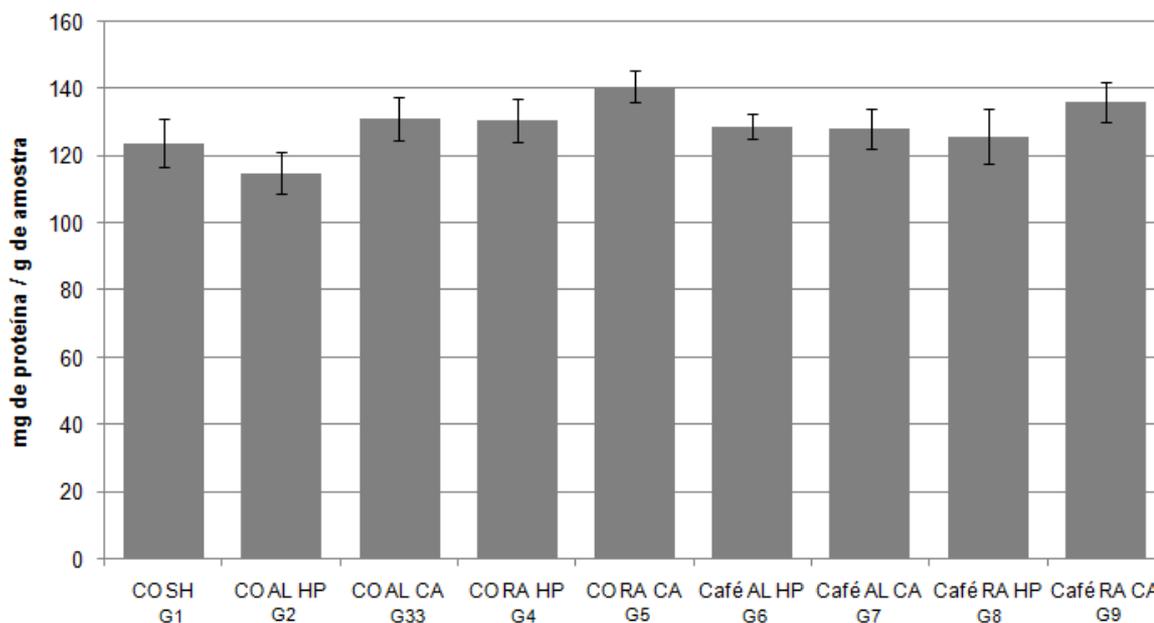


Figura 12 – Conteúdo hepático de proteína. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. **CO SH**: grupo de animais alimentados com dieta controle e submetidos à *sham* hepatectomia (n=8); **CO AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos à hepatectomia parcial (n=8); **CO AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (n=9); **CO RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial (n=8); **CO RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese (n=9); **Café AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos à hepatectomia parcial (n=8); **Café AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (n=11); **Café RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial (n=6); **Café RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese (n=11). Não foi observada diferença significativa no conteúdo de proteína hepática entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica hepática, avaliada como o conteúdo de TBARS, está representada na Figura 13. Não foram observados efeitos da restrição alimentar e da ingestão de café sobre o índice de peroxidação lipídica nos diferentes grupos de animais.

Foi observada redução significativa de 22,05% na peroxidação lipídica entre os animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e alimentados *ad libitum* com dieta controle (G3), quando comparados aos animais submetidos somente à HP e alimentados *ad libitum* com dieta controle (G2).

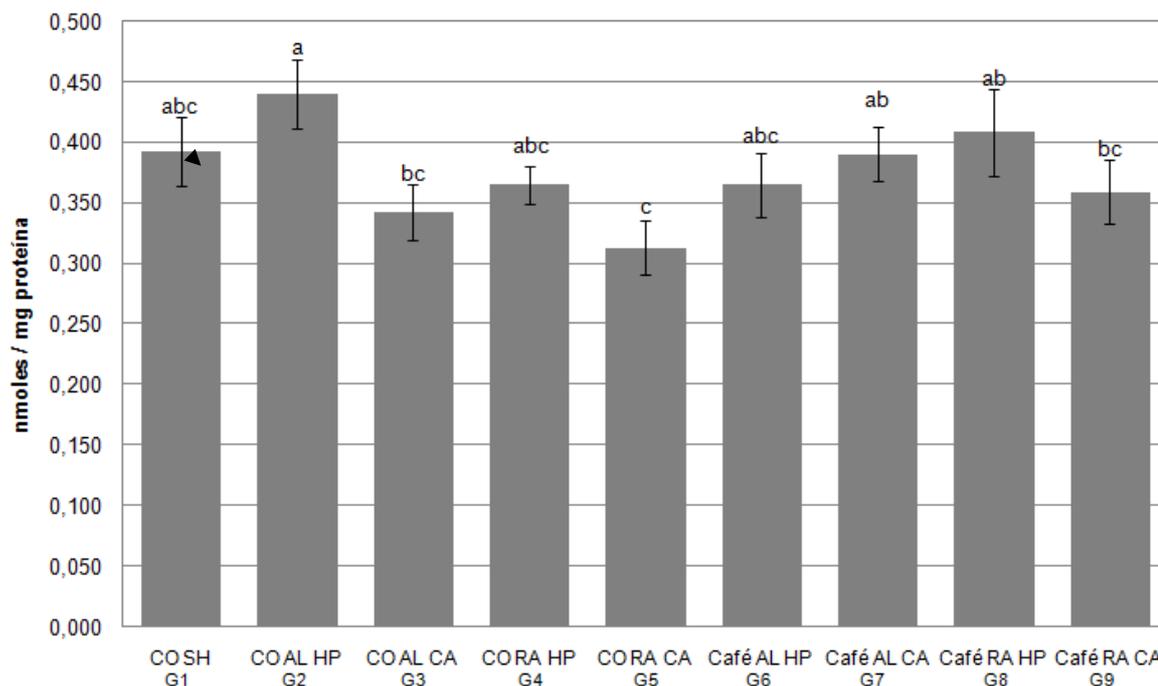


Figura 13 – Conteúdo hepático de TBARS. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. **CO SH**: grupo de animais alimentados com dieta controle e submetidos à *sham* hepatectomia (n=8); **CO AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos à hepatectomia parcial (n=8); **CO AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (n=9); **CO RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial (n=8); **CO RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese (n=9); **Café AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos à hepatectomia parcial (n=8); **Café AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (n=11); **Café RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial (n=6); **Café RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese (n=11). Letras sobrescritas distintas indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6 CONTEÚDO DE GLUTATIONA REDUZIDA

O conteúdo hepático de glutathiona reduzida (GSH) está representado na Figura 14. Os animais alimentados com dieta controle e submetidos à restrição alimentar apresentaram redução significativa no conteúdo hepático de GSH. Estes resultados foram observados tanto nos animais submetidos somente à HP (G4) quanto naqueles submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (G5), correspondendo a redução de 51,5% e 37,1%, respectivamente, quando comparados aos respectivos controle (G2 e G3).

Entre os animais submetidos à restrição alimentar e à HP, foi observado aumento significativo de 67,1% no conteúdo de GSH naqueles alimentados com dieta café (G8) quanto comparados àqueles que receberam dieta controle (G4).

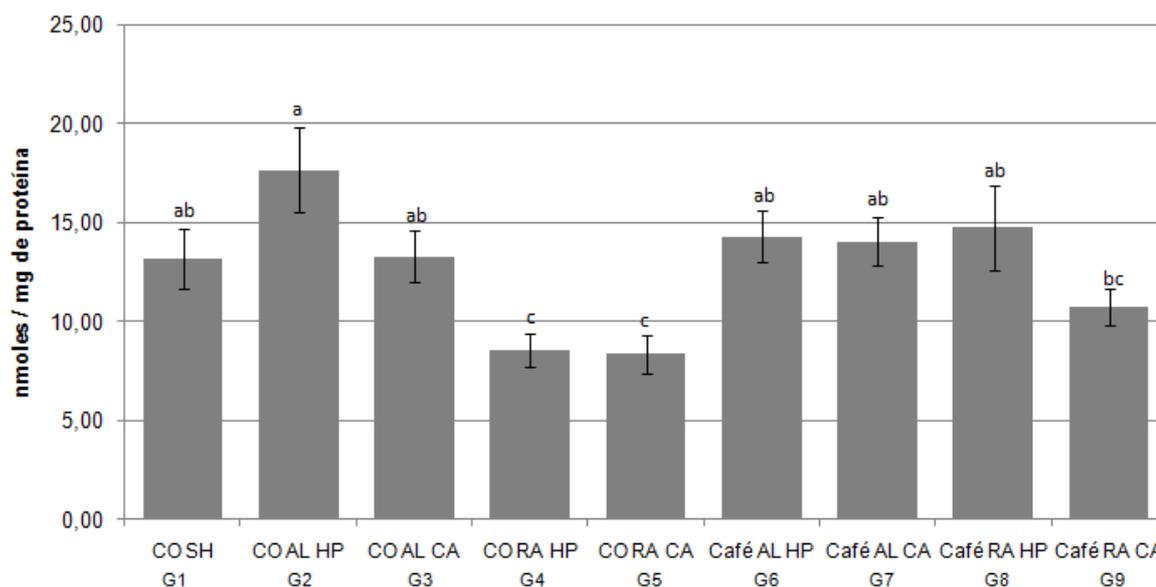


Figura 14 – Conteúdo hepático de glutatona reduzida. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. **CO SH**: grupo de animais alimentados com dieta controle e submetidos à *sham* hepatectomia (n=8); **CO AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos à hepatectomia parcial (n=8); **CO AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (n=9); **CO RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial (n=8); **CO RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese (n=9); **Café AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos à hepatectomia parcial (n=8); **Café AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (n=11); **Café RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial (n=6); **Café RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese (n=11). Letras sobrescritas distintas indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

#### 4.7 ATIVIDADE DA URIDINA DIFOSFATO GLICURONOSILTRANSFERASE

Na Figura 15 estão representados os valores de atividade hepática da uridina difosfato glicuronosiltransferase (UDPGT) dos animais experimentais. Entre os animais que receberam dieta café e foram submetidos somente à HP, foi observada redução de 19,9% na atividade da UDPGT naqueles submetidos à restrição alimentar (G8), quando comparados ao respectivo controle (G6).

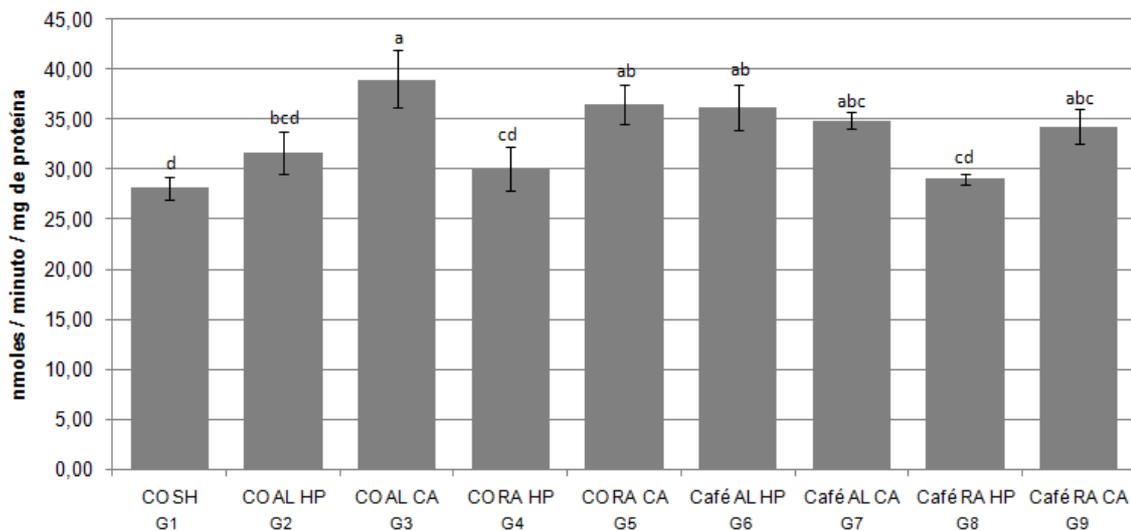


Figura 15 – Atividade hepática da uridina difosfato glicuronosiltransferase. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM de nmoles de glicuronato de *p*-nitrofenol por minuto por mg de proteína. **CO SH**: grupo de animais alimentados com dieta controle e submetidos à *sham* hepatectomia (n=8); **CO AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos à hepatectomia parcial (n=8); **CO AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (n=9); **CO RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial (n=8); **CO RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese (n=9); **Café AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos à hepatectomia parcial (n=8); **Café AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (n=11); **Café RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial (n=6); **Café RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese (n=11). Letras sobrescritas distintas indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Os animais que receberam dieta controle e foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese, tanto aqueles alimentados *ad libitum* (G3) quanto nos submetidos à restrição alimentar (G5), apresentaram aumento significativo da atividade da UDPGT, correspondendo a 23,0% e 21,5%, respectivamente, quando comparados aos animais que receberam dieta controle e foram submetidos somente à HP (G2 e G4, respectivamente).

Não foi observado efeito da ingestão de café sobre a atividade hepática da UDPGT.

#### 4.8 ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE

Na Figura 16 estão apresentados os valores de atividade hepática da glutatona S-transferase (GST). Não foi encontrada diferença significativa na atividade da GST entre os grupos de animais.

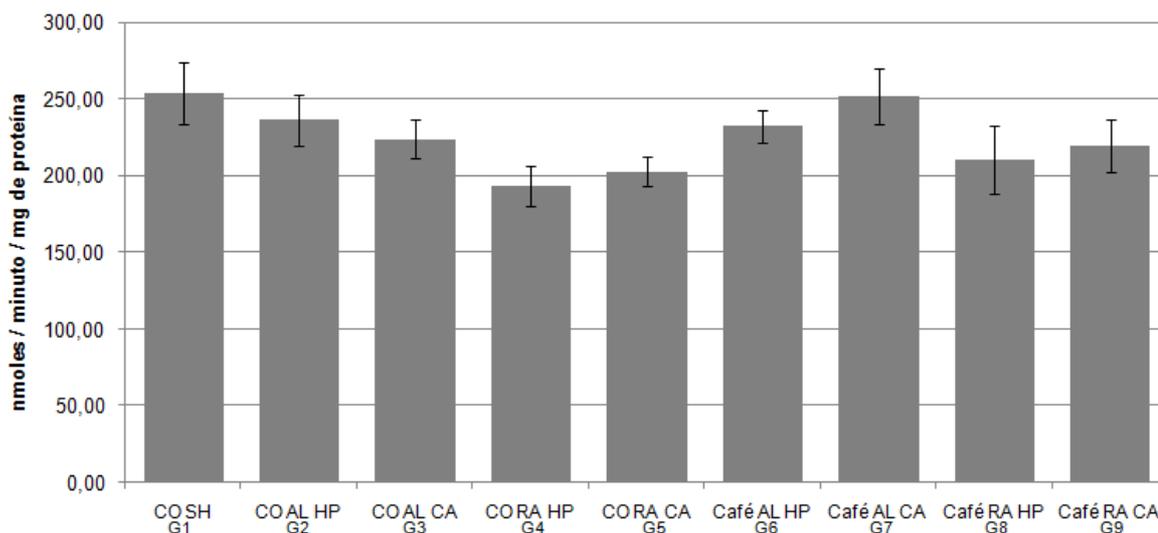


Figura 16 – Atividade hepática da glutatona S-transferase. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM de nmoles de 1-glutatiol 2,4-dinitrobenzeno por minuto por mg de proteína. **CO SH**: grupo de animais alimentados com dieta controle e submetidos à *sham* hepatectomia (n=8); **CO AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos à hepatectomia parcial (n=8); **CO AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (n=9); **CO RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial (n=8); **CO RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese (n=9); **Café AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos à hepatectomia parcial (n=8); **Café AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (n=11); **Café RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial (n=6); **Café RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese (n=11). Não foi observada diferença significativa na atividade da glutatona S-transferase hepática entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.9 ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE

Os valores da atividade hepática da glutatona redutase (GR) dos grupos de animais estão representados da Figura 17. Entre os animais alimentados com dieta café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese, aqueles submetidos à restrição alimentar (G9) apresentaram redução de 20,1% na atividade da enzima, quando comparados àqueles alimentados *ad libitum* (G7).

Foi observado aumento de 41,0% na atividade da GR nos animais alimentados *ad libitum* com dieta café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (G7) em relação aos animais alimentados *ad libitum* com dieta café e submetidos somente à HP (G6).

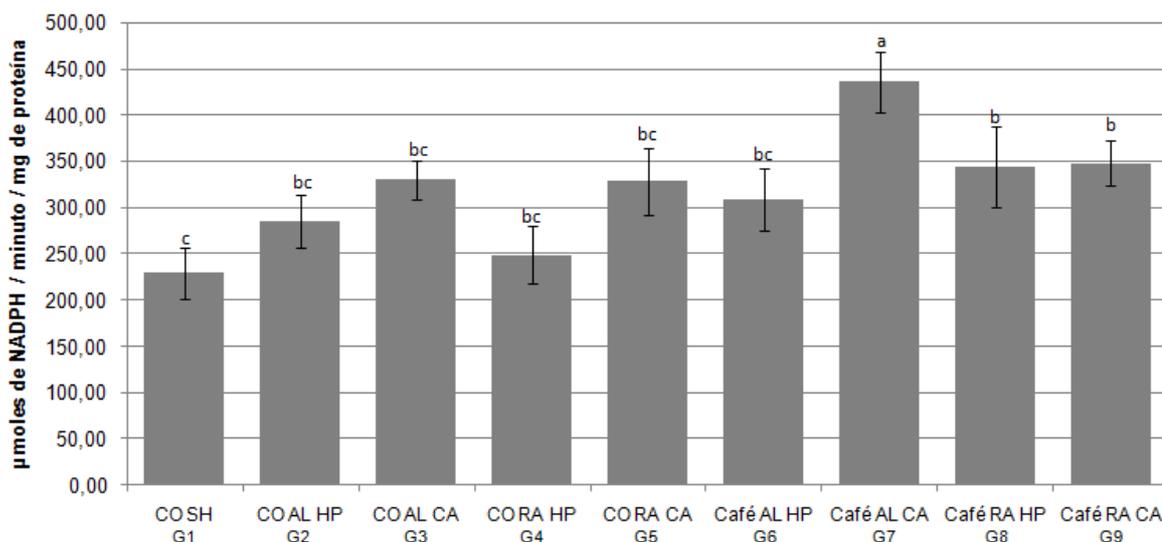


Figura 17 – Atividade hepática da glutatona redutase. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM de  $\mu$ moles de NADPH oxidado por minuto por mg de proteína. **CO SH**: grupo de animais alimentados com dieta controle e submetidos à *sham* hepatectomia (n=8); **CO AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos à hepatectomia parcial (n=8); **CO AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (n=9); **CO RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial (n=8); **CO RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta controle, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese (n=9); **Café AL HP**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos à hepatectomia parcial (n=8); **Café AL CA**: grupo de animais alimentados *ad libitum* com dieta adicionada de café e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (n=11); **Café RA HP**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e à hepatectomia parcial (n=6); **Café RA CA**: grupo de animais alimentados com dieta adicionada de café, submetidos à restrição alimentar e ao modelo de hepatocarcinogênese (n=11). Letras sobrescritas distintas indicam diferença significativa pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Os animais alimentados *ad libitum* com dieta café e submetidos à indução da hepatocarcinogênese (G7) apresentaram aumento de 38,0% na atividade hepática da enzima, quando comparados aos animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e submetidos à indução da hepatocarcinogênese (G3).

## 5 DISCUSSÃO

Desde que DOLL & PETO (1981) publicaram estudo enfatizando a contribuição dos hábitos de vida, especialmente da dieta, na incidência de câncer, numerosos estudos têm sido realizados no intuito de se identificarem alimentos ou constituintes alimentares que possam inibir, retardar ou reverter os múltiplos eventos patogênicos que levam ao câncer (SURH, 2003; CHEN & KONG, 2004; KWON *et al.*, 2007).

Neste contexto, no presente estudo foi investigado o efeito da ingestão diária de café e da restrição alimentar na modulação da hepatocarcinogênese química em ratos submetidos ao modelo hepatócito resistente (HR). Para a avaliação do café como alimento funcional sobre a carcinogênese hepática, os animais foram alimentados, diariamente a partir do desmame e ao longo da vida, com ração suplementada com extrato de café 8%. De acordo com resultados de estudos prévios desenvolvidos pelo nosso grupo (RAMOS, 2007; SILVA-OLIVEIRA *et al.*, 2010) e confirmados neste estudo, a suplementação da dieta com café não alterou a ingestão de ração pelos animais alimentados *ad libitum* e submetidos à hepatectomia. Isso refletiu no peso corporal semelhante entre os animais submetidos à hepatectomia parcial (HP) que receberam *ad libitum* dieta controle e aqueles que receberam *ad libitum* dieta suplementada com café.

Comparados aos animais submetidos somente à HP, os animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese HR apresentaram menor consumo de ração e, conseqüentemente, menor peso corporal a partir da primeira semana após a iniciação da carcinogênese, ou seja, a partir dos 49 dias de vida. O efeito da indução da hepatocarcinogênese na redução do consumo de ração e, conseqüentemente, no peso corporal dos animais manteve-se ao longo do experimento e foi menos acentuado nos animais que receberam dieta café do 49º ao 63º dia de vida. Estes resultados sugerem modulação pelo café dos efeitos tóxicos do carcinógeno utilizado na iniciação. Além disso, o ganho de peso corporal e o consumo de ração dos animais ao longo do experimento sugerem ausência de efeito adverso da ingestão diária de café na concentração usada no estudo. Dessa forma, os efeitos

observados do café, neste estudo, parecem ser específicos sobre o processo carcinogênico.

A média de ração consumida diariamente pelos ratos adultos alimentados *ad libitum* com dieta café foi 19,9 g, que é equivalente ao consumo diário de 19,9 mL de extrato de café preparado de maneira doméstica usual (8% de extrato de café torrado). Considerando a diferença entre o metabolismo humano e do rato, baseado na necessidade de ingestão calórica diária (32 kcal/kg de peso corporal para humanos e 220 kcal/kg de peso corporal para ratos), o consumo diário de café pelos ratos neste estudo foi equivalente ao consumo de 596 mL/dia por um humano adulto, correspondendo ao consumo moderado de café, segundo classificação de HAPPONEN *et al.* (2004).

Para a avaliação da restrição alimentar sobre a hepatocarcinogênese induzida quimicamente em ratos, os animais foram submetidos à restrição alimentar a partir da data do desmame, aos 21 dias de vida, e mantidos no mesmo regime ao longo do experimento. Foi utilizado modelo de restrição alimentar de 30% em relação ao consumo de dieta *ad libitum* pelo grupo Controle *sham*, evitando que alterações na ingestão alimentar por efeito da HP e da indução da carcinogênese causasse maior redução na quantidade de ração administrada aos animais submetidos à restrição alimentar. Considerando-se o efeito protetor da restrição alimentar sobre a carcinogênese, constatado em diferentes modelos animais (LONGO & FONTANA, 2010), o modelo de restrição foi utilizado no estudo com o intuito de verificar possível potencialização do efeito do café na modulação da hepatocarcinogênese induzida em ratos.

No presente estudo, o valor correspondente à relação entre o peso do fígado e o peso corporal animal foi utilizado para estimar o peso do fígado na data da hepatectomia e, posteriormente, a regeneração da massa hepática. Este fator, encontrado experimentalmente, está de acordo com a literatura (HIGGINS & ANDERSON, 1931) e os valores de peso do fígado estimados na data da hepatectomia utilizando-se este fator coincidiram com os encontrados utilizando-se o valor correspondente à relação entre o peso do fígado e peso do lobo hepático. Confirmando estudo anterior realizado por nosso grupo (SILVA-OLIVEIRA *et al.*, 2010), a ingestão de café e a indução da hepatocarcinogênese não interferiram na

regeneração do peso hepático dos animais. Da mesma forma, a regeneração hepática não foi alterada pela restrição alimentar.

A restrição alimentar imposta aos animais a partir do desmame foi efetiva em promover alterações na massa do organismo, quando avaliada pelo peso corporal e peso do fígado, confirmando dados de estudo anterior (KOLAJA *et al.*, 1996).

Os animais alimentados *ad libitum* com dieta controle e com dieta café apresentaram redução do peso do fígado na data da hepatectomia e na data do sacrifício, respectivamente, por efeito da indução da hepatocarcinogênese. A análise conjunta dos dados sugere que o efeito da carcinogênese no peso hepático pode ser resultado da alteração no consumo de ração e, conseqüentemente, do menor peso corporal observado entre estes animais. Sugere ainda postergação do efeito da indução da carcinogênese sobre o peso do fígado nos animais que receberam ração adicionada de café, indicando ação moduladora deste sobre alterações associadas ao modelo de hepatocarcinogênese utilizado no estudo.

As lesões pré-neoplásicas (LPN) resultam da expansão clonal de hepatócitos iniciados e precedem o aparecimento de tumores malignos, agindo como potenciais precursoras para etapas subsequentes do processo carcinogênico (FARBER & RUBIN, 1991). Usando o modelo HR, este estudo mostrou que a ingestão de café reduziu o número e a área hepática ocupada pelas LPN, identificadas como focos e nódulos de hepatócitos alterados de acordo com a arquitetura hepática e o padrão de coloração em Shorr e em hematoxilina e eosina.

Este resultado confirma dados de estudo anterior realizado pelo nosso grupo (SILVA-OLIVEIRA *et al.*, 2010), no qual animais alimentados com dieta café e submetidos ao mesmo modelo de hepatocarcinogênese apresentaram redução de 78,0% e 86,8%, respectivamente, no número total de LPN e na área ocupada pelas LPN no parênquima hepático. Estes resultados estão de acordo também com os de TANAKA *et al.* (1990), que encontraram proteção pelo café contra o desenvolvimento de tumores hepáticos induzidos por aminopirina e nitrito de sódio. Assim, embora utilizando modelos diferentes de indução da carcinogênese, os dois estudos mostram ação quimioprotetora do café sobre a hepatocarcinogênese. Em adição, nossos achados suportam resultados de recentes estudos epidemiológicos que têm mostrado relação inversa entre o consumo de café e o risco de

desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (INOUE *et al.*, 2005; OHFUJI *et al.*, 2006; TANAKA *et al.*, 2007).

O número de células em um tecido é determinado pelo equilíbrio entre a proliferação e a morte celular, mantendo a homeostase. Na carcinogênese, a proliferação celular aumentada está correlacionada ao aumento da taxa de aparecimento e crescimento de populações de células pré-neoplásicas e do tumor (CHOU *et al.*, 1995; BURSCH *et al.*, 2004). A contraparte fisiológica da replicação celular é a morte celular por apoptose, que constitui defesa inata do organismo contra a carcinogênese pela prevenção da sobrevivência de células danificadas geneticamente (BURSCH *et al.*, 2004). Em roedores, o bloqueio da apoptose tem se mostrado como importante mecanismo de promoção do tumor hepático (SCHULTE-HERMANN *et al.*, 1990; BURSCH *et al.*, 2004).

Com o objetivo de verificar se o efeito modulador do café sobre a carcinogênese hepática induzida em ratos é mediado por alteração na celularidade das LPN, este estudo avaliou a proliferação e a morte celular por apoptose. Um importante efeito da ingestão do café verificado neste estudo foi a redução na proliferação de células que constituem as LPN. Nossos resultados estão de acordo com os de estudo anterior realizado por TAI *et al.* (2010), que mostraram em cultura de células de câncer ovariano humano os efeitos antiproliferativos do café e de seus constituintes, cafeína, ácidos clorogênicos e ácido caféico. O efeito modulador do café sobre a celularidade foi também demonstrado por MIURA *et al.* (2004) em cultura de células de hepatoma, com interrupção do ciclo celular e indução da apoptose pela adição de café solúvel em pó. Aumento na apoptose por efeito do café também foi verificado por CONNEY *et al.* (2007) em camundongos submetidos à radiação UVB.

MIURA *et al.* (2004) demonstraram interrupção do ciclo celular em células de hepatoma quando café solúvel em pó foi adicionado ao meio de cultura na concentração de 0,3 mg/ml. No entanto, aumento na apoptose foi verificado somente quando a concentração de café adicionada foi aumentada para 0,6 mg/ml a 1,2 mg/ml. Considerando diferenças quanto ao modelo utilizado, *in vitro versus in vivo*, estes resultados sugerem que, no presente estudo a falta de constatação do efeito da ingestão de café sobre a apoptose de células que constituem as LPN poderia

resultar da dose utilizada. No entanto, vale destacar que o uso de maiores doses de café não corresponderia ao consumo humano moderado, comprometendo o objetivo do estudo em avaliar o efeito modulador do café como alimento funcional, oferecido diariamente aos animais em quantidade correspondente ao consumo humano.

A restrição alimentar desempenha papel protetor bem documentado no estágio de promoção da carcinogênese em fígado de roedores (LAGOPOULOS & STALDER, 1987; LAGOPOULOS *et al.*, 1991; KOLAJA *et al.*, 1996). O efeito modulador da restrição alimentar sobre a proliferação celular e apoptose é verificado em diferentes órgãos, incluindo o fígado. Em modelos de carcinogênese hepática foi demonstrado que a restrição alimentar apresenta capacidade de inibir a proliferação celular e de aumentar a apoptose de hepatócitos normais e daqueles constituintes de LPN, sugerindo que parte do seu efeito protetor sobre o câncer hepático ocorre via mecanismo anti-proliferativo e pró-apoptótico (JAMES & MUSKHELISHVILI, 1994; KOLAJA *et al.*, 1996).

No presente estudo, os animais submetidos à restrição alimentar de 30% não apresentaram alteração no número ou na área ocupada pelas LPN no parênquima hepático. Da mesma forma, não foram observados efeitos da restrição alimentar sobre a proliferação celular e apoptose nas LPN. Utilizando o modelo de hepatocarcinogênese HR, KISHIMA *et al.* (2000) também não encontraram alteração no desenvolvimento de LPN no fígado de ratos submetidos à restrição alimentar de 50%. LAGOPOULOS *et al.* (1991) mostraram em modelo de hepatocarcinogênese que o efeito protetor da restrição alimentar é mais facilmente observado quando esta é iniciada mais precocemente. Estes resultados sugerem que, utilizando o modelo HR, a restrição alimentar deve ser mais rigorosa, em intensidade ou em duração, para que seu efeito modulador sobre a carcinogênese seja eficaz e mais claramente demonstrável. Essa mesma consideração poderia explicar, neste estudo, a não constatação de alteração na celularidade por efeito da restrição alimentar. Além disso, vale ressaltar que, enquanto o efeito da restrição alimentar sobre a proliferação celular no rato é tecido dependente, o efeito sobre a apoptose varia de acordo com a espécie animal, sendo encontrado efeito indutor quando avaliada em camundongos e efeito variável quando avaliada em ratos (LU *et al.*, 2002).

Além da celularidade, eventos bioquímicos estão também diretamente relacionados à carcinogênese química e a interferência nestes eventos pode resultar em prevenção ou modulação da carcinogênese. Com o intuito de investigar possíveis explicações para o efeito modulador do café e da restrição alimentar sobre a hepatocarcinogênese quimicamente induzida em ratos, neste estudo foi analisado o efeito dos mesmos sobre a peroxidação lipídica, sobre o sistema antioxidante endógeno, representado pela GSH e GR, bem como sobre a atividade das conjugases UDPGT e GST.

A peroxidação lipídica, avaliada no presente estudo pela determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, não foi alterada pela restrição alimentar. Estes resultados confirmam os encontrados por WU *et al.* (2003), que mostraram que a restrição alimentar de 35% por 12 semanas não alterou a peroxidação lipídica no fígado de camundongos em fase de desenvolvimento, nem a atividade de enzimas do sistema antioxidante endógeno como catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. No mesmo estudo, alterações nestes parâmetros por efeito da restrição alimentar de 20% e 35% foram observadas somente nos animais submetidos ao modelo de restrição por 24 semanas. Estes dados sugerem que o tempo de restrição utilizado no estudo poderia explicar a falta de constatação de redução na peroxidação lipídica por efeito da restrição alimentar.

No presente estudo a peroxidação lipídica também não foi alterada por efeito da ingestão de café. Estudos prévios realizados por nosso grupo mostraram que a ingestão de café diariamente ao longo da vida reduziu a peroxidação lipídica em membranas cerebrais (ABREU *et al.*, 2011) e membranas de hepatócitos de ratos (ABREU & MORAES-SANTOS, 2011). Por outro lado, a análise em hepatócitos de animais em desenvolvimento alimentados diariamente com ração adicionada de café, de maneira semelhante aos nossos resultados, não mostrou alteração na peroxidação lipídica (GOMES, 2004).

Estes resultados, no entanto, não excluem a redução na peroxidação lipídica como possível mecanismo de proteção do café sobre a hepatocarcinogênese. De fato, o café torrado tem componentes com potente atividade antioxidante (FUSTER *et al.*, 2000; YANAGIMOTO *et al.*, 2004), capazes de aumentar a atividade antioxidante plasmática *in vivo* (NATELLA *et al.*, 2002), inibir a formação *in vitro* e *ex*

*vivo* de radicais peroxila, evitando a peroxidação lipídica da membrana celular (DAGLIA *et al.*, 2000; DAGLIA *et al.*, 2004), bem como suprimir a mutagenicidade causada por oxidantes como ter-butil-hidroperóxido (STADLER *et al.*, 1994).

A redução na peroxidação lipídica hepática por efeito da ingestão de café (ABREU *et al.*, 2011; ABREU & MORAES-SANTOS, 2011) e pela restrição alimentar (WU *et al.*, 2003) geralmente está relacionada ao aumento no teor de GSH e na atividade de enzimas do sistema antioxidante endógeno, como a GR, glutatona peroxidase, catalase e superóxido dismutase. No entanto, efeitos benéficos da ingestão de café e da restrição alimentar sobre o conteúdo de GSH e sobre a atividade da GR, descritos na literatura não foram confirmados no presente estudo. Aumento no conteúdo de GSH e na atividade da GR por efeito da ingestão de café foi verificado somente entre os animais submetidos à restrição alimentar e à HP. Por outro lado, a restrição alimentar diminuiu o conteúdo de GSH e a atividade da GR nos animais que receberam dieta controle e nos que receberam dieta café e foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese.

Alterações em alguns marcadores bioquímicos, como redução na peroxidação lipídica e aumento na atividade da GR e da UDPGT foram observadas no presente estudo por efeito da indução da carcinogênese. Estas, entre outras alterações como aumento no teor de GSH, são observadas em modelos de hepatocarcinogênese (BANASCH, 1986) e são muitas vezes sugeridas como adaptações funcionais que permitem aos hepatócitos que constituem as LPN sobreviverem em ambiente hostil (FARBER & RUBIN, 1991).

O efeito protetor do café e da restrição alimentar sobre a carcinogênese tem sido, muitas vezes, atribuído à capacidade de modificarem a atividade de enzimas biotransformadoras de xenobióticos. Estudo realizado por HUBER *et al.* (2003) mostrou aumento significativo na atividade hepática das enzimas GST e UDPGT após 10 e 20 dias de tratamento com café de preparação tipo turca na água oferecida aos animais. Da mesma forma, TURESKY *et al.* (2003) e ABREU & MORAES-SANTOS (2011) mostraram aumento na atividade hepática das enzimas GST e UDPGT em ratos alimentados diariamente com ração adicionada de extrato de café liofilizado.

No presente estudo, a avaliação de enzimas de desintoxicação como possíveis mecanismos de modulação da hepatocarcinogênese pelo café e pela restrição alimentar não confirmou aumento na atividade das transferases GST e UDPGT. A atividade da GST não foi alterada pela ingestão de café ou pela restrição alimentar, enquanto a atividade da UDPGT foi diminuída pela restrição alimentar nos animais que receberam dieta café e foram submetidos à HP.

Com a perda de unidades funcionais do fígado pela hepatectomia parcial, células hepáticas residuais são estimuladas a proliferar, diferenciar e restaurar a massa, a estrutura e a função hepáticas normais. No rato, o volume e a capacidade funcional hepática são restaurados em torno de 10 a 15 dias após a HP (GOULART, 2003). No estudo, as análises bioquímicas foram realizadas no fígado recém-regenerado, 21 dias após a hepatectomia. Embora a literatura mostre capacidade funcional hepática já restabelecida neste período, é possível que o fígado recém-regenerado não apresente condições de responder a estímulos indutores ou inibidores da expressão de genes, o que refletiria na não constatação de alteração na atividade enzimática por efeito da ingestão de café ou da restrição alimentar.

## 6 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que a ingestão diária de café exerceu ação moduladora sobre a hepatocarcinogênese em ratos Wistar submetidos ao modelo HR, conforme verificado pelo menor número e tamanho das LPN nos animais que se alimentaram com dieta suplementada com café.

A restrição alimentar de 30% imposta aos animais a partir do desmame não apresentou ação moduladora sobre a hepatocarcinogênese no modelo estudado. Da mesma forma, a restrição alimentar não alterou a celularidade nas LPN.

A ingestão diária de ração adicionada de café diminuiu a proliferação celular nas LPN, sugerindo ser este um dos mecanismos pelos quais a bebida exerce efeito modulador sobre a hepatocarcinogênese neste modelo.

Utilizando o modelo HR não foi possível verificar alterações na apoptose, na peroxidação lipídica, no conteúdo de GSH e na atividade da enzima antioxidante GR e das enzimas de desintoxicação hepática UDPGT e GST como possível mecanismo de quimioproteção do café sobre a hepatocarcinogênese. No entanto, estes e outros mecanismos para a ação moduladora da bebida, bem como da restrição alimentar, sobre a hepatocarcinogênese não devem ser excluídos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Café). Disponível em: <<http://www.abic.com.br>> Acesso em: 16 mar 2011.
- ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Café). Norma de qualidade recomendável e boas práticas de fabricação de cafés torrados em grão e cafés torrados e moídos, 2008. Disponível em: [http://www.abic.com.br/arquivos/pqc\\_norma\\_qualidade\\_dez08.pdf](http://www.abic.com.br/arquivos/pqc_norma_qualidade_dez08.pdf). Acesso em: 15 jun 2009.
- ABREU, R.V.; SILVA-OLIVEIRA, E.M.; MORAES, M.F.D.; PEREIRA, G.S.; MORAES-SANTOS, T. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 99, n. 4, p. 659-664, 2011.
- ABREU, R.V.; MORAES-SANTOS, T. The protective effect of coffee against paracetamol-induced hepatic injury in rats. *J. Food Biochem.*, v. 35, p. 1653-1659, 2011.
- ALBANES, D. Total calories, body weight, and tumor incidence in mice. *Cancer Res.*, v. 47, n. 8, p. 1987-1992, 1987.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat. Res.*, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.
- BANNASCH, P. Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. I. Hepatic preneoplasia. *Carcinogenesis*, v. 7, n. 5, p. 689-695.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.*, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BOCK, K.W.; BURCHELL, B.; DUTTON, G.J.; HANNINEN, O.; MULDER, G.J.; OWENS, I.S.; SIEST, G.; TEPHLY, T.R. UDP-glucuronosyltransferase activities: Guidelines for consistent interim terminology and assay conditions. *Biochem. Pharmacol.*, v. 32, n. 6, p. 953-955, 1983.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. *A situação do câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2006.

- BRASILEIRO FILHO, G.; PEREIRA, F.E.L.; GUIMARÃES, R.C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celulares. *In: BRASILEIRO FILHO, G. (Ed.) Bogliolo Patologia Geral. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. v.1, p. 227-281.*
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, v. 52, p. 302-310, 1978.
- BURSCH, W.; GRASL-KRAUPP, B.; WASTL, U.; HUFNAGL, K.; CHABICOVSKY, M.; TAPER, H.; SCHULTE-HERMANN, R. Role of apoptosis for mouse liver growth regulation and tumor promotion: Comparative analysis of mice with high (C3H/He) and low (C57Bl/6J) cancer susceptibility. *Toxicol. Lett.*, v. 149, n. 1-3, p. 25-35, 2004.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, v. 250, n. 14, p. 5475-5480, 1975.
- CAVIN, C.; BEZENCON, C.; GUIGNARD, G.; SCHILTER, B. Coffee diterpenes prevent benzo[a]pyrene genotoxicity in rat and human culture systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 306, n. 2, p. 488-495, 2003.
- CAVIN, C.; HOLZHAUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W.W.; SCHILTER, B. Cafestol and Kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem. Toxicol.*, v. 40, n. 8, p. 1155-1163, 2002.
- CAVIN, C.; HOLZHÄUSER, D.; CONSTABLE, A.; HUGGETT, A.C.; SCHILTER, B. The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol protect against aflatoxin B<sub>1</sub>-induced genotoxicity through a dual mechanism. *Carcinogenesis*, v. 19, n. 8, p.1369-1375, 1998.
- CAVIN, C.; MACE, K.; OFFORD, E.A.; SCHILTER, B. Protective effects of coffee diterpenes against aflatoxin B<sub>1</sub>-induced genotoxicity: Mechanisms in rat and human cells. *Food Chem. Toxicol.*, v. 39, n. 6, p. 549-556, 2001.
- CHEN, C.; KONG, A.N.T. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 36, n. 12, p. 1505-1516, 2004.
- CHEN, F.; WANG, W.; EL-DEIRY, W.S. Current strategies to target p53 in cancer. *Biochem. Pharmacol.*, v. 80, n. 5, p. 724-730, 2010.

- CHO, S.G.; CHOI, E.J. Apoptotic signaling pathways: Caspases and stress-activated protein kinases. *J. Biochem. Mol. Biol.*, v. 35, n. 1, p. 24-27, 2002.
- CHOU, M.W.; SHADDOCK, J.G.; KONG, J.; HART, R.W.; CASCIANO, D.A. Effect of dietary restriction on partial hepatectomy-induced liver regeneration of aged F344 rats. *Cancer Lett.*, v. 91, n. 2, p. 191-197, 1995.
- CLAYSON, D.B.; ARNOLD, D.L. The classification of carcinogenesis identified in the rodent bioassay as potential risks to humans: What type of substance should be tested next? *Mutat. Res.*, v. 257, n. 1, p. 91-106, 1991.
- COATES, P.J.; LORIMORE, S.A.; WRIGHT, E.G. Cell and tissue responses to genotoxic stress. *J. Pathol.*, v. 205, n. 2, p. 221-235, 2005.
- COLMAN, R.J.; ANDERSON, R.M.; JOHNSON, S.C.; KASTMAN, E.K.; KOSMATKA, K.J.; BEASLEY, T.M.; ALLISON, D.B.; CRUZEN, C.; SIMMONS, H.A.; KEMNITZ, J.W.; WEINDRUCH, R. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, v. 325, n. 5937, p. 201-204, 2009.
- COMMANDEUR, J.N.M.; STIJNTJES, G.J.; VERMEULEN, N.P.E. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of the glutathione S-conjugates: Role in the bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol. Rev.*, v. 47, n. 2, p. 271-330, 1995.
- CONNEY, A.H.; ZHOU, S.; LEE, M.J.; XIE, J.G.; YANG, C.S.; LOU, Y.R.; LU, Y. Stimulatory effect of oral administration of tea, coffee or caffeine on UVB-induced apoptosis in the epidermis of SKH-1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 224, n. 3, p. 209-213, 2007.
- CONYBEARE, G. Effect of quality and quantity of diet on survival and tumor incidence in outbred Swiss mice. *Food Cosmet. Toxicol.*, v. 18, n. 1, p. 65-75, 1980.
- COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med.*, v. 22, n. 4-5, p. 217-246, 2001.
- DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; GREGOTTI, C.; BERTÈ, F.; GAZZANI, G. *In vitro* antioxidant and *ex vivo* protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 48, p. 1449-1454, 2000.

- DAGLIA, M.; RACCHI, M.; PAPETTI, A.; LANNI, C.; GOVONI, S.; GAZZANI, G. *In vitro* and *ex vivo* antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* v. 52, n. 6, p. 1700-1704, 2004.
- DAVYDOV, D.R. Microsomal monooxygenase in apoptosis: another target for cytochrome c signaling? *Trends Biochem. Sci.*, v. 26, n. 3, p. 155-160, 2001.
- DEVASAGAYAM, T.P.A.; KAMAT, J.P.; MOHAN, H.; KESAVAN, P.C. Caffeine as an antioxidant: Inhibition of lipid peroxidation in induced by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1282, n. 1, p. 63-70, 1996.
- DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the united states today. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 66, n. 6, p. 1191-1308, 1981.
- DRAGAN, Y.P.; PITOT, H.C. The role of the stages of initiation and promotion in phenotypic diversity during hepatocarcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis*, v. 13, n. 5, p. 739-750, 1992.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.
- DUNN, S.E.; KARI, F.W.; FRENCH, J.; LEININGER, J.R.; TRAVLOS, G.; WILSON, R.; BARRETT, J.C. Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. *Cancer Res.*, v. 57, n. 21, p. 4667-4672, 1997.
- DUNN, S.E.; KARI, F.W.; FRENCH, J.; LEININGER, J.R.; TRAVLOS, G.; WILSON, R.; BARRETT, J.C. Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. *Cancer Res.*, v. 57, n. 21, p. 4667-4672, 1997.
- ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, v. 35, n.4, p. 495-516, 2007.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). *Economia cafeeira*. Disponível em: <[http://www22.sede.embrapa.br/cafe/consorcio/index\\_2.htm](http://www22.sede.embrapa.br/cafe/consorcio/index_2.htm)> Acesso em: 08 jul 2005.
- ENGELBERGS, J.; THOMALE, J.; RAJEWSKY, M.F. Role of DNA repair in carcinogen-induced *ras* mutation. *Mutat. Res.*, v. 450, n. 1-2, p. 139-153, 2000.

- ENOMOTO, K.; FARBER, E. Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. *Cancer Res.*, v. 42, n. 6, p. 2330-2335, 1982.
- ESPÍNDOLA, R.M.; MAZZANTINI, R.P.; ONG, T.P.; CONTI A.; HEIDOR, R.; MORENO, F.S. Geranylgeraniol and  $\beta$ -ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation, total plasma cholesterol and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF-kB activation. *Carcinogenesis*, v. 26, n. 6, p. 1091-1099, 2005.
- FARBER, E.; RUBIN, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. *Cancer Res.*, v. 51, n. 11, p. 2751-2761, 1991.
- FARBER, E. Cell proliferation as a major risk factor for cancer: A concept of doubtful validity. *Cancer Res.*, v. 55, n. 17, p. 3759-3762, 1995.
- FERRARI, C.K.B.; TORRES, E.A.F.S. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomed. Pharmacother.*, v. 57, n. 5-6, p. 251-260, 2003.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil.*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FONSECA, E.M.A.V.; CHAGAS, C.E.A.; MAZZANTINI, R.P.; HEIDOR, R.; ONG, T.P.; MORENO, F.S. All-*trans* and 9-*cis* retinoic acids, retinol and  $\beta$ -carotene chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve distinct actions on glutathione S-transferase positive preneoplastic lesions remodeling and DNA damage. *Carcinogenesis*, v. 26, n. 11, p. 1940-1946, 2005.
- FONTANA, L.; KLEIN, S. Aging, adiposity, and calorie restriction. *JAMA*, v. 297, n. 9, p. 986-994, 2007.
- FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, v. 14, n. 2, p. 144-149, 2008.
- FUSTER, M.D.; MITCHELL, A.E.; OCHI, H.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, n. 11, p. 5600-5603, 2000.
- GARRETT, M.D. Cell cycle control and cancer. *Curr. Sci.*, v. 81, n. 5, 2001.

- GELATTI, U.; COVOLO, L.; FRANCESCHINI, M.; PIRALI, F.; TAGGER, A.; RIBERO, M.L.; TREVISI, P.; MARTELLI, C.; NARDI, G.; DONATO, F. Coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma independently of its aetiology: A case-control study. *J. Hepatol.*, v. 42, n. 4, p. 528-534, 2005.
- GOMES, G.B. *Efeito do café sobre o sistema de biotransformação hepático de ratos durante o crescimento e desenvolvimento*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2004. 60 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- GONZALEZ, F.J. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: Studies with CYP2E1. *Mutat. Res.*, v. 569, n. 1-2, p. 101-110, 2005.
- GOODMAN, J.I.; WATSON, R.E. Altered DNA methylation: A secondary mechanism involved in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 42, p. 501-525, 2002.
- GOULART, M.G.V. *Efeitos do verapamil (dilacorón®), bloqueador dos canais de cálcio, na regeneração do fígado de ratos após hepatectomia parcial*. Piracicaba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas. 2003. 178 p. (Tese, Doutorado em Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica).
- GROSS, G.; JACCAUD, E.; HUGGETT, A.C. Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in coffee brews. *Food Chem. Toxicol.*, v. 35, n.6, p. 547-554, 1997.
- GROSS, L.; DREYFUSS, Y. Prevention of spontaneous and radiation-induced tumors in rats by reduction of food intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 87, n. 17, p. 6795-6797, 1990.
- GROSS, L.; DREYFUSS, Y. Reduction in the incidence of radiation-induced tumors in rats after restriction of food intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 81, n. 23, p. 7596-7598, 1984.
- GUENGERICH, F.P. Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J. Biol. Chem.*, v. 266, n. 16, p. 10019-10022, 1991.
- GUILLEMETTE, C. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J.*, v. 3, n. 3, p. 136-158, 2003.

- HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY W.B. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr. Rev.*, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.
- HANIGAN, M.H.; PITOT, H.C. Gamma-glutamyl transpeptidase: Its role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 6, n. 2, p. 165-172, 1985.
- HAPPONEN, P.; VOUTILAINEN, S.; SALONEN, J.T. Coffee drinking is dose-dependently related to the risk of acute coronary events in middle-aged men. *J. Nutr.*, v. 134, n. 9, p. 2381-2386, 2004.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.
- HEBER, D. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. *J. Postgrad. Med.*, v. 50, n. 2, p. 145-149, 2004.
- 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.
- HODGSON, E.; ROSE, R.L. The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals. *Pharmacol. Ther.*, v. 113, n. 2, p. 420-428, 2007.
- HSU, S.M. RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 29, n. 4, p. 557-580, 1981.
- HU, W. The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, v. 1, n. 6, p. a001073, 2009.
- HUBER, W.W.; MCDANIEL, L.P.; KADERLIK, K.R.; TEITEL, C.H.; LANG, N.P.; KADLUBAR, F.F. Chemoprotection against the formation of colon DNA adducts from the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine (PhIP) in the rat. *Mutat. Res.*, v. 376, n. 1-2, p. 115-122, 1997.

- HUBER, W.W.; PRUSTOMERSKY, S.; DELBANCO, E.; UHL, M.; SCHARF, G.; TURESKY, R.J.; THIER, R.; SCHULTE-HERMANN, R. Enhancement of the chemoprotective enzymes glucuronosyl transferase and glutathione transferase in specific organs of the rat by the coffee components kahweol and cafestol. *Arch. Toxicol.*, v. 76, n. 4, p. 209-217, 2002<sub>a</sub>.
- HUBER, W.W.; SCHARF, G.; ROSSMANITH, W.; PRUSTOMERSKY, S.; GRASL-KRAUPP, B.; PETER, B.; TURESKY, R.J.; SCHULTE-HERMANN, R. The coffee components kahweol and cafestol induce gamma-glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of chemoprotective glutathione synthesis, in several organs of the rat. *Arch. Toxicol.*, v. 75, n. 11-12, p. 685-694, 2002<sub>b</sub>.
- HUBER, W.W.; SCHARF, G.; NAGEL, G.; PRUSTOMERSKY, S.; SCHULTE-HERMANN, R.; KAINA, B. Coffee and its chemopreventive components kahweol and cafestol increase the activity of *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in rat liver – comparison with phase II xenobiotic metabolism. *Mutat. Res.*, v. 522, n. 1-2, p. 57-68, 2003.
- HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. *Quím. Nova*, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.
- HURSTING, S.D.; KARI, F.W. The anti-carcinogenic effects of dietary restriction: Mechanisms and future directions. *Mutat. Res.*, v. 443, n. 1-2, p. 235-249, 1999.
- HURSTING, S.D.; LAVIGNE, J.A.; BERRIGAN, D.; PERKINS, S.N.; BARRET, J.C. Calorie restriction, aging, and cancer prevention: Mechanisms of action and applicability to humans. *Annu. Rev. Med.*, v. 54, p. 131-152, 2003.
- ICO (International Coffee Organization). *The story of coffee*. Disponível em: <<http://www.ico.org>> Acesso em: 08 jul 2005.
- INCA (Instituto Nacional do Câncer). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>> Acesso em: 16 mar 2011.
- INOUE, M.; YOSHIMI, I.; SOBUE, T.; TSUGANE, S. Influence of coffee drinking on subsequent risk of hepatocellular carcinoma: A prospective study in Japan. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 97, n. 4, p. 293-300, 2005.

- ITO, N.; TAMANO, S.; SHIRAI, T. A medium-term rat liver bioassay for rapid *in vivo* detection of carcinogenic potential of chemicals. *Cancer Sci.*, v. 94, n. 1, p. 3-8, 2003.
- JAMES, S.J.; MUSKHELISHVILI, L. Rates of apoptosis and proliferation vary with caloric intake and may influence incidence of spontaneous hepatoma in C57BL/6 x C3H F1 mice. *Cancer Res.*, v. 54, n. 21, p. 5508-5510, 1994.
- KAMATH, S.A.; RUBIN, E. Interaction of calcium with microsomes: A modified method for the rapid isolation of rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 49, n. 1, p. 52-59, 1972.
- KEMNITZ, J.W. Calorie restriction and aging in nonhuman primates. *ILAR J.*, v. 52, n. 1, p. 66-77, 2011.
- KERMODE-SCOTT, B.: Coffee is associated with lower risk of breast cancer in women with BRCA mutations. *BMJ*, v. 332, p. 70, 2006.
- KHAVARI, D.A.; SEN, G.L.; RINN, J.L. DNA methylation and epigenetic control of cellular differentiation. *Cell Cycle*, v. 9, n. 19, p. 3880-3883, 2010.
- KISHIMA, M.O.; BARBISAN, L.F.; ESTEVÃO, D.; RODRIGUES, M.A.; VIANA DE CAMARGO, J.L. Promotion of hepatocarcinogenesis by hexachlorobenzene in energy-restricted rats. *Cancer Lett.*, v. 152, n. 1, p. 37-44, 2000.
- KLURFELD, D.M.; WELCH, C.B.; DAVIS, M.J.; KRITCHEVSKY, D. Determination of degree of energy restriction necessary to reduce DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats during the promotion phase. *J. Nutr.*, v. 119, n. 2, p. 286-291, 1989.
- KOLAJA, K.L.; BUNTING, K.A.; KLAUNIG, J. E. Inhibition of tumor promotion and hepatocellular growth by dietary restriction in mice. *Carcinogenesis*, v. 17, n. 8, p. 1657-1664, 1996.
- KONG, T.A.; YU, R.; HEBBAR, V.; CHEN, C.; OWUOR, E.; HU, R.; EE, R.; MANDLEKAR, S. Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds. *Mutat. Res.*, v. 480-481, p. 231-241, 2001.
- KRITCHEVSKY, D. Colorectal cancer: The role of dietary fat and caloric restriction. *Mutat. Res.*, v. 290, n. 1, p. 63-70, 1993.

- KWON, K.H.; BARVE, A.; YU, S.; HUANG, M.T.; KONG, A.N.T. Cancer chemoprevention by phytochemicals: Potential molecular targets, biomarkers and animal models. *Acta Pharmacol. Sin.*, v. 28, n. 9, p. 1409-1421, 2007.
- LAGOPOULOS, L.; STALDER, R. The influence of food intake on the development of diethylnitrosamine-induced liver tumours in mice. *Carcinogenesis*, v. 8, n. 1, p. 33-37, 1987.
- LAGOPOULOS, L.; SUNAHARA, G. I.; WÜRZNER, H.; FLIESEN, T.; STALDER, R. The correlation of body growth with diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in relation to serum insulin and somatomedin-C. *Carcinogenesis*, v. 12, n. 2, p. 211-215, 1991.
- LANE, M.A.; BLACK, A.; HANDY, A.; TILMONT, E.M.; INGRAM, D.K.; ROTH, G.S. Caloric restriction in primates. *Ann. NY Acad. Sci.*, v. 928, p. 287-295, 2001.
- LIDDLE, C.; STEDMAN, C.A.M. Hepatic metabolism of drugs. In: RODÉS, J.; BENHAMOU, J.P.; BLEI, A.; REICHEN, J.; RIZZETTO, M. *Textbook of Hepatology: From basic science to clinical practice*. 3. ed. Wiley-Blackwell, 2007. p. 241-249.
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: Mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v. 37, n. 3, 2001.
- LONGO, V.D.; FONTANA, L. Calorie restriction and cancer prevention: Metabolic and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 31, n. 2, p. 89-98, 2010.
- LOUREIRO, A.P.M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: Implicações em mutagênese e carcinogênese. *Quím. Nova*, v. 25, n. 5, p. 777-793, 2002.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- LU, M.H.; WARBRITTON, A.; TANG, N.; BUCCI, T.J. Dietary restriction alters cell proliferation in rats: an immunohistochemical study by labeling proliferating cell nuclear antigen. *Mech. Ageing Devel.*, v. 123, p. 391-400, 2002.
- LUCH, A. Nature and nurture: Lessons from chemical carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, v. 5, n. 2, p. 113-125, 2005.

- MAJER, B.J.; HOFER, E.; CAVIN, C.; LHOSTE, E.; UHL, M.; GLATT, H.R.; MEINL, W.; KNASMÜLLER, S. Coffee diterpenes prevent the genotoxic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N-nitrosodimethylamine in a human derived liver cell line (HepG2). *Food Chem. Toxicol.*, v. 43, n. 3, p. 433-441, 2005.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer*, v. 9, n. 3, p. 153-166, 2009.
- MANHÃES-ROCHA, D.A. *Alterações de enzimas de biotransformação na fase inicial da esquistossomose mansônica murina*. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública – Fundação Oswaldo Cruz. 2004. 133 p. (Dissertação, Mestrado em Saúde Pública – Área de Concentração em Toxicologia).
- MARTIN, S.T.; BLACK, S.D. Detergent effects in rabbit liver microsomal UDP-Glucuronosyltransferase studied by means of a continuous spectrophotometric assay with p-nitrophenol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 200, n. 2, p. 1093-1098, 1994.
- MASELLA, R.; DI BENEDETTO, R.; VARI, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, v. 16, n. 10, p. 577-586, 2005.
- MIURA, Y.; ONO, K.; OKAUCHI, R.; YAGASAKI, K. Inhibitory effect of coffee on hepatoma proliferation and invasion in culture and on tumor growth, metastasis and abnormal lipoprotein profiles in hepatoma-bearing rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v. 50, n. 1, p. 38-44, 2004.
- MONTEIRO, M.C.; TRUGO, L.C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quím. Nova*, v. 28, n. 4, p. 637-641, 2005.
- MORENO, F.S.; WU, T.S.; PENTEADO, M.V.C.; RIZZI, M.B.S.L.; JORDÃO JR, A.A.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; DAGLI, M.L.Z. A comparison of  $\beta$ -carotene and vitamin A effects on a hepatocarcinogenesis model. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, v. 65, n. 2, p. 87-94, 1995.
- MORENO, F.S.; TOLEDO, L.P.; CONTI, A.; HEIDOR, R.; JORDÃO JR, A.; VANNUCCHI, H.; CARDOZO, M.T.; ONG, T.P. Lutein presents suppressing but not blocking chemopreventive activity during diethylnitrosamine-induced

- hepatocarcinogenesis and this involves inhibition of DNA damage. *Chem. Biol. Interact.*, v. 168, n. 3, p. 221-228, 2007.
- NATELLA, F.; NARDINI, M.; GIANNETTI, I.; DATTILO, C.; SCACCINI, C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 6211-6216, 2002.
- NEHLIG, A. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 23, n. 4, p. 563-576, 1999.
- NEPKA, C.; SIVRIDIS, E.; ANTONOGLU, O.; KORTSARIS, A.; GEORGELLIS, A.; TAITZOGLU, I.; HYTIROGLOU, P.; PAPADIMITRIOU, C.; ZINTZARAS, I.; KOURETAS, D. Chemopreventive activity of very low dose dietary tannic acid administration in hepatoma bearing C3H male mice. *Cancer Lett.*, v. 141, n. 1-2, p. 57-62, 1999.
- NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.*, v. 104, n. 12, p. 6255-6285, 2004.
- OGAWA, K.; SOLT, D.B.; FARBER, E. Phenotypic diversity as an early property of putative preneoplastic hepatocyte populations in liver carcinogenesis. *Cancer Res.*, v. 40, n. 3, p. 725-733, 1980.
- OHFUJI, S.; FUKUSHIMA, W.; TANAKA, T.; HABU, D.; TAMORI, A.; SAKAGUCHI, H.; TAKEDA, T.; KAWADA, N.; SEKI, S.; NISHIGUCHI, S.; SHIOMI, S.; HIROTA, Y. Coffee consumption and reduced risk of hepatocellular carcinoma among patients with chronic type C liver disease: A case-control study. *Hepatol. Res.*, v. 36, n. 3, p. 201-208, 2006.
- OLIVEIRA, P.A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ P., L.F.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.
- ONG, T.P.; HEIDOR, R.; CONTI, A.; DAGLI, M.L.Z.; MORENO, F.S. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. *Carcinogenesis*, v. 27, n. 6, p. 1194-1203, 2006.

- PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.
- PARKINSON, A.; OGILVIE, B.W. Biotransformation of xenobiotics. In: KLAASSEN, C.D. (Ed.). *Toxicology: The basic science of poisons*. 7 ed. New York: McGraw-Hill, 2008. p. 161-304.
- PAROLIN, M.B.; REASON, I.J.M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arq. Gastroenterol.*, v. 38, n. 2, 2001.
- PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta.*, v. 333, n. 1, p. 19-39, 2003.
- PERES, W.A.F.; PAULA, T.P.; SILVA, R.A.R.N.; COELHO, H.S.M. A atuação da vitamina A e carotenóides na hepatocarcinogênese. *Rev. Bras. Cancerol.*, v. 49, n. 2, p. 113-120, 2003.
- PITOT, H.C.; DRAGAN, Y.P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *Mech. Carcin. – The FASEB J.*, v. 5, n. 9, p. 2280-2286, 1991.
- RAMOS, M.E. *Efeito modulador do café sobre o sistema cardiovascular em ratos*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 68 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- RIEDL, S.J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 5, n. 11, p. 897-907, 2004.
- ROTH, G.S.; INGRAM, D.K.; LANE, M.A. Calorie restriction in primates: Will it work and how will we know? *J. Am. Geriatr. Soc.*, v. 47, n. 7, p. 896-903, 1999.
- SAMPAIO, A.R.D.; CHAGAS, C.E.A.; ONG, T.P.; MORENO, F.S. Vitamin A and  $\beta$ -carotene inhibitory effect during 1,2-dimethylhydrazine induced hepatocarcinogenesis potentiated by 5-azacytidine. *Food Chem. Toxicol.*, v. 45, n. 4, p. 563-567, 2007.
- SANTOS, F.G.A.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, J.E.S.; CASSALI, G.D.; PAIXÃO, T.A.; MARTINS, A.S.; SILVA, S.S.; MARTINS, R.F.; MORO, L. Apoptosis in the transplanted canine transmissible venereal tumor during growth and regression phases. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 60, n. 3, p. 607-612, 2008.

- SATOH, K.; KITAHARA, A.; SOMA, Y.; INABA, Y.; HATAYAMA, I.; SATO, K. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: A new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 82, n. 12, p. 3964-3968, 1985.
- SCHAFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, 2001.
- SCHERER, E.; EMMELLOT, P. Kinetics of induction and growth of precancerous liver-cell foci, and liver tumour formation by diethylnitrosamine in the rat. *Eur. J. Cancer*, v. 11, n. 10, p. 689-696, 1975.
- 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, n. 16, p. 5127-5135, 1990.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.
- 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, n. 5, p. 643-645, 1987.
- SHACKELFORD, R.E.; KAUFMANN, W.K.; PAULES, R.S. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ. Health Perspect.*, v. 107, Suppl. 1, p. 5-24, 1999.
- SHIMAZU, T.; TSUBONO, Y.; KURIYAMA, S.; OHMORI, K.; KOIZUMI, Y.; NISHINO, Y.; SHIBUYA, D.; TSUJI, I. Coffee consumption and the risk of primary liver cancer: Pooled analysis of two prospective studies in Japan. *Int. J. Cancer*, v. 116, n. 1, p. 150-154, 2005.
- SHIMOKAWA, I.; HIGAMI, Y.; YU, B.P.; MASORO, E.J.; IKEDA, T. Influence of dietary components on occurrence of and mortality due to neoplasms in male F344 rats. *Aging (Milano)*, v. 8, n. 4, p. 254-262, 1996.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

- SILVA-OLIVEIRA, E.M.; FERNANDES, P.A.; MORAES-SANTOS, T. Effect of coffee on chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Nutr. Cancer*, v. 62, n. 3, p. 336-342, 2010.
- SINGH, R.P.; SHARAD, S.; KAPUR, S. Free Radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: Relevance of dietary antioxidants. *JACM*, v. 5, n. 3, p. 218-225, 2004.
- SOLT, D.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, v. 263, p. 701-703, 1976.
- SOUTHORN, P.A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin. Proc.*, v. 63, n. 4, p. 381-389, 1988.
- SQUIRE, R.A.; LEVITT, M.H. Report of a workshop on classification of specific hepatocellular lesions in rats. *Cancer Res.*, v. 35, n. 11, p. 3214-3223, 1975.
- STADLER, R.H.; TURESKY, R.J.; MÜLLER, O.; MARKOVIC J.; LEONG-MORGENTHALER, P.M. The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity. *Mutat. Res.*, v. 308, n. 2, p. 177-190, 1994.
- SURH, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer*, v. 3, n. 10, p. 768-780, 2003.
- TAI, J.; CHEUNG, S.; CHAN, E.; HASMAN, D. Antiproliferation effect of commercially brewed coffees on human ovarian cancer cells *in vitro*. *Nutr. Cancer*, v. 62, n. 8, p. 1044-1057, 2010.
- TAITZOGLOU, I.A.; TSANTARLIOTOU, M.P.; NEPKA, C.; ZERVOS, I.; MALTEZOS, E.; KOURETAS, D.; KOKOLIS, N.A. Dietary administration of tannic acid lowers plasminogen activator activity in the liver of C3H hepatoma bearing male mice. *In vivo*, v. 14, n. 6, p. 767-771, 2000.
- TANAKA, T.; NISHIKAWA, A.; SHIMA, H.; SUGIE, S.; SHINODA, T.; YOSHIMI, N.; IWATA, H.; MORI, H. Inhibitory effects of chlorogenic acid, reserpine, polyphenolic acid (E-5166), or coffee on hepatocarcinogenesis in rats and hamsters. *Basic Life Sci.*, v. 52, p. 429-440, 1990.
- TANAKA, K.; HARA, M.; SAKAMOTO, T.; HIGAKI, Y.; MIZUTA, T.; EGUCHI, Y.; YASUTAKE, T.; OZAKI, I.; YAMAMOTO, K.; ONOHARA, S.; KAWAZOE, S.; SHIGEMATSU, H.; KOIZUMI, S. Inverse association between coffee drinking

- and the risk of hepatocellular carcinoma: A case-control study in Japan. *Cancer Sci.*, v. 98, n. 2, p. 214-218, 2007.
- TATEMATSU, M.; NAGAMINE, Y.; FARBER, E. Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. *Cancer Res.*, v. 43, n. 11, p. 5049-5058, 1983.
- TAVANI, A.; BERTUZZI, M.; TALAMINI, R.; GALLUS, S.; PARPINEL, M.; FRANCESCHI, S.; LEVI, F.; LA VECCHIA, C. Coffee and tea intake and risk of oral, pharyngeal and esophageal cancer. *Oral Oncol.*, v. 39, n. 7, p. 695-700, 2003.
- THOMPSON, H.J.; ZHU, Z.; JIANG, W. Dietary energy restriction in breast cancer prevention. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia*, v. 8, n. 1, p. 133-142, 2003.
- TKACZYK, J.; VÍZEK, M. Oxidative stress in the lung tissue: Sources of reactive oxygen species and antioxidant defence. *Prague Med. Rep.*, v. 108, n. 2, p. 105-114, 2007.
- TUKEY, R.H.; STRASSBURG, C.P. Human UDP-glucuronosyltransferases: Metabolism, expression, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 40, p. 581-616, 2000.
- TURESKY, R. J.; RICHOZ, J.; CONSTABLE, A.; CURTIS, K. D.; DINGLEY, K. H.; TURTELTAUB, K. W. The effects of coffee on enzymes involved in metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in rats. *Chem. Biol. Interact.*, v. 145, n. 3, p. 251-265, 2003.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Quím. Nova*, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.*, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.

- WCRF/AICR (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research). *Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: A Global perspective*. Washington DC: AICR; 2007. p. 4-29.
- WILKINSON, G.R. Farmacocinética: Dinâmica da absorção, da distribuição e da eliminação dos fármacos. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 3-23.
- WU, A.; SUN, X.; WAN, F.; LIU, Y. Modulations by dietary restriction on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in developing mice. *J. Appl. Physiol.*, v. 94, n. 3, p. 947-952, 2003.
- YAGI, K.A. A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, v. 15, p. 212-216, 1976.
- YANAGIMOTO, K.; OCHI, H.; LEE, K.G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, n. 3, p. 592-596, 2004.
- YU, B.P.; MASORO, E.J.; MCMAHAN, C.A. Nutritional influences on aging of Fisher 344 rats: 1. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *J. Gerontol.*, v. 40, n. 6, p. 657-670, 1985.