

ELIANE MORETO SILVA OLIVEIRA

EFEITO MODULADOR DO CAFÉ SOBRE A
CARCINOGENESE HEPÁTICA
INDUZIDA EM RATOS

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2007

ELIANE MORETO SILVA OLIVEIRA

EFEITO MODULADOR DO CAFÉ SOBRE A
CARCINOGENESE HEPÁTICA
INDUZIDA EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Tasso Moraes e Santos
Co-orientadora: Prof^a. Paula Ávila Fernandes

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2007

Este estudo é dedicado àqueles que representam o que tenho de melhor na vida: meu pai, minha mãe, Deyvis, Tida, Adilson, Cau, Julinha e Lalá.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia, pelo Dom da vida;

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

À Prof^a. Paula Ávila Fernandes pela atenção, paciência e co-orientação, fundamentais para a concretização deste estudo;

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

Aos amigos do laboratório de Nutrição Experimental, Antônio Massensini Júnior, Gustavo Henrique de Souza Rezende, Marclênia Eduardo Ramos, Maria das Graças Vilela Torquato, Renata Lacerda de Lima, Renata Viana Abreu, Ricardo Dornas, Silmara Araújo, Vinícius Oliveira Paganini e Wagner Miranda Barbosa pela colaboração, amizade e muitos bons momentos compartilhados;

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

Ao Prof. Ricardo Santiago Gomez e alunos do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Patológica e Cirurgia Odontológica da Faculdade de Odontologia; à Prof^a. Lúcia Porto Fonseca de Castro e Maria de Lourdes Barroso Gomes do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina - UFMG; ao Prof. André Ricardo Massensini do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG; à Prof^a. Cláudia Rocha Carvalho e Raquel Alves Costa do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG; ao Prof. José Renan da Cunha Melo do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina - UFMG e, de forma especial, ao Prof. Luis Guillermo Coca Velarde do Departamento de Estatística da Universidade Federal Fluminense.

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

E a todos que, de diferentes maneiras, acreditaram, incentivaram e contribuíram para a realização deste estudo.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	1
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Fígado e o sistema de biotransformação	14
2.2 Regeneração hepática	16
2.3 Carcinogênese química e hepatocarcinogênese experimental	18
2.4 Marcadores bioquímicos de lesões pré-neoplásicas	23
2.5 Modelo hepatócito resistente	25
2.6 Alimentos funcionais e quimioprevenção do câncer	26
2.7 Café e quimioproteção	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Equipamentos	33
4.2 Reagentes químicos	33
4.3 Caracterização e extração do café	33
4.4 Preparo das dietas	34
4.5 Desenho experimental	35
4.6 Indução da hepatocarcinogênese	36
4.7 Hepatectomia parcial	37
4.8 Peso corporal e regeneração hepática	38
4.9 Análise morfológica e morfométrica	38
4.10 Determinação da atividade da γ -glutamiltanspeptidase	40
4.11 Determinação de proteína	41
4.12 Análise estatística dos dados	42
5 RESULTADOS	43
5.1 Peso corporal, peso do fígado e regeneração hepática	43
5.2 Análise morfológica e morfométrica	44
5.2.1 Análise macroscópica	44
5.2.2 Análise microscópica	45
5.2.3 Análise morfométrica	48
5.5 Atividade da γ -glutamiltanspeptidase	49
6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	50
7 CONCLUSÃO	54
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação recomendada para lesões hepatocelulares específicas observadas na carcinogênese experimental em roedores.....	20
Tabela 2 - Composição centesimal dos grãos de café verdes e torrados.....	30
Tabela 3 - Composição nutricional centesimal e valor calórico das dietas controle e café	34
Tabela 4 - Peso corporal, ganho de peso corporal pós-hepatectomia, peso do fígado e regeneração hepática.....	43
Tabela 5 - Morfometria de LPN em cortes histológicos corados para G6Pase de animais submetidos ao modelo HR.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Apresentação esquemática do desenho experimental.	36
Figura 2 - Apresentação esquemática do protocolo de indução da hepatocarcinogênese.....	37
Figura 3 - Fotografia de fígado de animal submetido ao modelo HR	44
Figura 4 - Fotomicrografia de corte histológico de fígado corado pela reação histoquímica para G6Pase de animal submetido à HP.	46
Figura 5 - Fotomicrografia de corte histológico de fígado corado pela reação histoquímica para G6Pase de animal submetido ao modelo HR.	46
Figura 6 - Fotomicrografias de corte histológico de fígado submetido à reação histoquímica para G6Pase apresentando nódulo persistente (A) e em remodelação (B).	47
Figura 7 - Atividade da GGT nos diferentes grupos experimentais.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AAF	2-Acetilaminofluoreno
DEN	Dietilnitrosamina
G6Pase	Glicose-6-fosfatase
GGT	γ -Glutamiltanspeptidase
HP	Hepatectomia parcial
HR	Hepatócito resistente
LPN	Lesões pré-neoplásicas
-NH ₂	Grupo amino
-OH	Grupo hidroxila
-SH	Grupo sulfidril
UDP	Uridina difosfato

RESUMO

O café é uma bebida de grande popularidade e consumida mundialmente, havendo diferentes estudos concernentes às suas implicações na saúde. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do café sobre a hepatocarcinogênese em ratos submetidos ao modelo hepatócito resistente (HR). Foram utilizados ratos Wistar machos alimentados com ração suplementada ou não com 1,5% de café liofilizado e submetidos ao modelo HR. A hepatocarcinogênese foi induzida pela administração de dietilnitrosamina e 2-acetilaminofluoreno seguida de hepatectomia parcial para estímulo mitogênico. Os animais foram sacrificados com aproximadamente 110 dias de vida e os fígados foram removidos e pesados. Procedeu-se a análise morfométrica das lesões pré-neoplásicas (LPN) em cortes histológicos do fígado submetidos à técnica histoquímica para identificação da enzima glicose-6-fosfatase. Os animais que receberam dieta suplementada com café apresentaram redução de 78% no número de LPN, 85,5% no número de nódulos persistentes, 70,5% no número de nódulos de remodelação e 86,8% na área hepática ocupada pelas LPN. Analisou-se a atividade da enzima γ -glutamiltanspeptidase em homogeneizado do fígado regenerado. A menor atividade da enzima no grupo de animais que recebeu dieta suplementada com café, embora não estatisticamente significativa, corrobora os resultados obtidos pela análise histoquímica. O menor número e tamanho das LPN indicam que o café exerce ação moduladora na hepatocarcinogênese química, sugerindo ação protetora deste alimento.

Palavras-chave: Alimento funcional; Café; Hepatocarcinogênese química.

ABSTRACT

Coffee is a very popular drink, worldily consumed, with different studies related to its health protection. The goal of the present study was to investigate the effect of coffee on the carcinogenesis in rats submitted to the hepatocarcinogenesis resistant hepatocyte (RH) model. Male Wistar rats, fed diet supplemented or not with 1.5% of lyophilized coffee and submitted to the RH model, were used. Hepatocarcinogenesis was induced by administration of diethylnitrosamine and 2-acetylaminofluorene followed by partial hepatectomy for mitogenic stimulus. The animals were sacrificed around 110 days of life and the livers were removed and weighed. Morphometric analysis was performed in liver slices using glucose-6-phosphatase enzyme as histochemical marker for preneoplastic lesions (PNL). The animals fed coffee diet had reduced PNL number in 78%, persistent nodules number in 85.5%, remodeling nodules number in 70.5% and PNL total area in 86.8%. γ -glutamyltranspeptidase enzyme activity in liver homogenate was determined. Enzyme activity was decreased in animals fed coffee diet, despite of non-statistically significant, supported the results found by the histochemistry analysis. The decreased in number and size of PNL indicates a modulation of coffee on chemical hepatocarcinogenesis, suggesting a protective effect.

Key words: Coffee; Functional food; Chemical hepatocarcinogenesis.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pela formação de uma massa de tecido anormal, cujo crescimento excede e é desorganizado em relação ao tecido normal. Este crescimento persiste mesmo após a interrupção do estímulo que o evocou (ROBBINS et al., 2000).

O câncer tem causas variadas, externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente cultural e social. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (INCA, 2007).

A 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 ambientais e ocupacionais cancerígenos, pode trazer bons resultados na redução da incidência desta doença (BRASIL, 2006).

A quimioproteção contra o câncer pode resultar da ação de uma substância que possa bloquear o início do processo neoplásico, deter ou reverter a progressão das células iniciadas para fenótipos malignos. A quimioproteção pode ocorrer por diferentes mecanismos que incluem redução da intoxicação por metabólitos carcinogênicos e/ou aumento da desintoxicação (CHEN & KONG, 2004).

Estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais mostram que muitos constituintes da dieta, entre os quais encontram-se curcumina, licopeno, polifenóis, isoflavonas, β -caroteno, estão associados à quimioproteção contra diferentes tipos de câncer em órgãos como mama, próstata, pulmão, cólon, estômago, fígado e rim. Dentre os mecanismos descritos para estes constituintes estão: prevenção de danos oxidativos ao DNA pela ação antioxidante, promoção de reparos no DNA, indução de apoptose e da resposta imunológica, inibição de enzimas da FASE I e ativação de enzimas da FASE II do sistema de biotransformação de xenobióticos, redução da produção do fator de crescimento semelhante à insulina que é responsável pela

proliferação de algumas linhagens de células tumorais, entre outros (FERRARI & TORRES, 2003; HEBER, 2004).

Estudos mostram que diferentes 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, antimutagênicas e anticarcinogênicas (DEVASAGAYAM et al., 1996; NEPKA et al., 1999; CAVIN et al., 2002). As propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas parecem estar associadas com modificações benéficas sobre o sistema de biotransformação hepático (CAVIN et al., 2002; HUBER et al., 2003), ao aumento na atividade da O^6 -metilguanina-DNA metiltransferase (HUBER et al., 2003) e à estimulação do sistema antioxidante endógeno (ABREU, 2005).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do café sobre a hepatocarcinogênese em ratos submetidos ao modelo hepatócito resistente. Para isso, foram analisadas lesões pré-neoplásicas negativas para a atividade da enzima glicose-6-fosfatase em cortes submetidos à técnica histoquímica, bem como a atividade da γ -glutamyltranspeptidase em homogeneizado do fígado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FÍGADO E O SISTEMA DE BIOTRANSFORMAÇÃO

O fígado é a maior glândula do corpo humano, pesando cerca de 1400 a 1600 g em um adulto, o que corresponde a aproximadamente 2,5% do peso corporal. Ele situa-se no quadrante superior direito da cavidade abdominal, aderido à superfície inferior do diafragma (ROBBINS et al., 2000).

A unidade funcional do fígado é o lóbulo, estrutura de forma poliédrica com 0,8 a 2 mm de diâmetro e vários milímetros de comprimento. Nestes, os hepatócitos se dispõem em placas (lâminas) contínuas e unicelulares que se irradiam da veia centrolobular (GUYTON & HALL, 2002).

No local de junção dos lóbulos, existe um conjunto de estruturas denominado espaço-porta, composto por um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática, um ducto biliar e vasos linfáticos, envoltos por bainha de tecido conjuntivo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

O fígado recebe a maior parte do seu sangue pela veia porta (cerca de 70%) e menor quantidade através da artéria hepática. Pela veia porta chega ao órgão todo o material absorvido nos intestinos, com exceção de parte dos lipídios que é transportada por via linfática (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

Do espaço-porta o sangue venoso e arterial é distribuído para uma rede de capilares sinusóides que ocupam o espaço entre as placas de hepatócitos. As paredes dos sinusóides são revestidas por células endoteliais típicas e células de Kupffer, que são dotadas de funções múltiplas como formação de anticorpos, hematopoiese e fagocitose. O sangue percorre os sinusóides e é recolhido na veia centrolobular, que é o ramo inicial da veia hepática. Desta o sangue flui para a veia cava inferior (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

O fígado é órgão de múltiplas funções entre as quais estão o processamento e síntese de substâncias que são transportadas para outras áreas do organismo. Desempenha, ainda, funções específicas para o organismo no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios, e de inúmeras outras no armazenamento de

vitaminas e de ferro (CHARLTON , 1996; GUYTON & HALL, 2002; KLOVER & MOONEY, 2004).

O fígado é também o principal órgão envolvido na biotransformação e eliminação de compostos química e estruturalmente diversos, de natureza endógena e exógena, aos quais o organismo está freqüentemente exposto (CARVALHO, 1995). Estes últimos são chamados de xenobióticos e incluem compostos como fármacos, poluentes ambientais e outros (HODGSON & ROSE, 2007).

Durante o processo de biotransformação, enzimas transformam compostos orgânicos em moléculas mais solúveis e, portanto, mais facilmente excretáveis. O processo de biotransformação de xenobióticos é classificado em reações de FASE I, catalisadas por enzimas microsossomais, e de FASE II, que envolvem enzimas principalmente citossólicas (CHEN & KONG, 2004). As enzimas das FASES I e II coexistem numa mesma célula e o equilíbrio entre suas funções determina a adequada atividade biológica (HODGSON & ROSE, 2007).

Na FASE I, grupos polares ($-OH$, $-NH_2$ ou $-SH$) são introduzidos na molécula do xenobiótico, tornando-a menos lipofílica. As reações de FASE I envolvem hidrólise, redução e oxidação de xenobióticos por enzimas relativamente não específicas, denominadas monooxigenases. A oxidação é a reação mais importante no metabolismo da FASE I e é catalisada por enzimas dependentes do citocromo P450 geralmente conhecidas como monooxigenases de função mista. Estas enzimas são responsáveis pela FASE I do metabolismo da grande maioria de substratos endógenos, bem como dos xenobióticos, e têm como função proteger o organismo de substâncias químicas ingeridas e absorvidas diariamente (HODGSON & ROSE, 2007).

Nas reações da FASE II os compostos alterados na FASE I 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. Os cofatores destas reações reagem com grupos funcionais que estão presentes no xenobiótico ou que foram expostos/introduzidos durante a FASE I da biotransformação, gerando metabólitos altamente polares e, geralmente, de fácil eliminação pela via renal ou biliar (GONZALEZ, 2005).

A glicuronidação é catalisada pelas uridina difosfato (UDP) glicuronosil transferases e é a reação de conjugação mais importante em termos quantitativos

(BURCHELL et al., 1995). No entanto, a conjugação de metabólitos tóxicos ativos de xenobióticos com a glutathione representa a principal via de desintoxicação de drogas e carcinógenos, protegendo as células contra danos ao DNA causados por compostos eletrofílicos mutagênicos, radicais livres e intermediários reativos do oxigênio formados durante a biotransformação. Esta conjugação é catalisada por uma família de glutathione S-transferases (PASTORE et al., 2003).

A glutathione (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine) é o mais abundante tiol em todos os tecidos animais e o principal tiol não-proteína envolvido na defesa antioxidante celular. Ela está presente em altas concentrações no hepatócito, onde participa, na forma de glutathione reduzida, como agente redutor em reações de oxidação-redução do sistema de biotransformação de xenobióticos (PASTORE et al., 2003).

Muitos compostos químicos tornam-se farmacologicamente ou toxicologicamente ativos somente após sua transformação pelas enzimas biotransformadoras de xenobióticos da FASE I. Dessa forma, esta 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 reações de biotransformação contribuem para a desintoxicação do organismo. Entretanto, ao lado deste aspecto benéfico, o processo de biotransformação, especialmente a oxidação de substâncias pelo citocromo P450, pode gerar intermediários tóxicos, eletrofílicos, mutagênicos ou carcinogênicos (HODGSON & ROSE, 2007). Dependendo da velocidade das reações de ativação e de desintoxicação os metabólitos podem seguir duas vias: a) combinam-se com compostos endógenos altamente polares e facilmente excretáveis na urina ou na bile; ou, b) ligam-se covalentemente a compostos e biomoléculas celulares como DNA, RNA ou proteína, produzindo toxicidade, mutações, transformações e morte celular (PELKONEN & NEBERT, 1982; GONZALEZ et al., 1988).

2.2 REGENERAÇÃO HEPÁTICA

O fígado é um órgão constituído predominantemente de hepatócitos, uma célula de natureza epitelial altamente diferenciada que, em condições normais, raramente se divide (RAMALHO et al., 1993). Entretanto, sua capacidade

proliferativa se mantém extremamente elevada em resposta a condições que induzem perda celular (HIGGINS & ANDERSON, 1931; MELO et al., 2003).

Em animais, a perda de tecido hepático funcionante por injúria química, viral, trauma ou hepatectomia parcial (HP) desencadeia processo regenerativo até que a massa hepática seja completamente restaurada. Dessa forma, a regeneração hepática representa um mecanismo de proteção orgânica que promove crescimento tecidual altamente ordenado e organizado (RAMALHO, 2000).

O mito de Prometheus indica que o fenômeno regenerativo já era conhecido na Grécia antiga. Tendo descoberto e repassado aos homens o segredo do fogo dos deuses do Olimpo, Prometheus foi condenado por Zeus a alimentar diariamente uma águia com parte do seu fígado. No entanto, durante a noite seu fígado regenerava-se, provendo a águia com eterno alimento e submetendo Prometheus a eterna tortura (RAMALHO, 2000).

O primeiro modelo experimental bem sucedido para o estudo da regeneração hepática foi introduzido por HIGGINS & ANDERSON em 1931 e é, até hoje, um dos mais usados em estudos que envolvem regeneração hepática em roedores. Esse modelo de HP consiste em remoção cirúrgica dos lobos lateral esquerdo e médio do fígado de ratos, os quais representam aproximadamente 65 a 75% da massa hepática total desses animais.

Na HP os lobos ressecados não são recuperados. A restauração ocorre por hiperplasia e hipertrofia celular compensatória do parênquima remanescente, de forma regulada e precisa, envolvendo todas as células hepáticas (JESUS et al., 2000).

Em ratos, a regeneração hepática inicia-se dentro de seis horas após a HP e é máxima entre a 24^a e 30^a hora, quando diminui progressivamente nos próximos 10 a 15 dias. De seis a 24 horas após a HP, ocorre aumento no tamanho do núcleo e do citoplasma. Num segundo estágio, entre a 24^a e 30^a hora, ocorre rápida fase de divisão celular, mas as células permanecem com tamanho aumentado. Durante um terceiro estágio que dura aproximadamente 15 dias, a divisão celular diminui progressivamente e a mitose torna-se menos evidente. Na 3^a semana pós-hepatectomia o parênquima hepático apresenta-se completamente normal (LAMBERT, 1965). O aumento no peso dos lobos remanescentes é o sinal mais evidente da regeneração. Ao final da hepatectomia, o fígado remanescente

representa 29,4% do total, alcança 45,3% até 24 horas após a operação, 102,3% no 21º dia e 110,9% ao final de 28 dias (HIGGINS & ANDERSON, 1931).

2.3 CARCINOGENESE QUÍMICA E HEPATOCARCINOGENESE EXPERIMENTAL

Carcinogênese é um termo genérico que compreende os vários mecanismos que participam do desenvolvimento de neoplasias malignas. Ela pode ocorrer de forma espontânea ou ser induzida por agentes físicos, químicos, biológicos ou genéticos (PITOT & DRAGAN, 1991).

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. 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 aductos. Sendo formados por mecanismos químicos específicos, tais aductos podem levar a mutações em proto-oncogenes ou em genes supressores de tumor. Os aductos podem também modular a função do gene sem alterar a seqüência do DNA, mas alterando a proteína resultante (GOODMAN & WATSON, 2002).

Na carcinogênese química, durante a biotransformação do carcinógeno, ocorre formação de diferentes espécies reativas de oxigênio pela cadeia respiratória mitocondrial, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. O estresse oxidativo que acompanha a metabolização dos carcinógenos causa dano adicional ao DNA, aumentando a formação de aductos. 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 conseqüências da carcinogênese iniciada quimicamente (CHEN & KONG, 2004).

A carcinogênese é um processo de múltiplos estágios, no qual ocorre a transformação seqüencial de células normais para malignas via algumas populações de células intermediárias. A formação e o desenvolvimento destas populações intermediárias de células resultam de etapas de iniciação, promoção e progressão (PITOT & DRAGAN, 1991).

A iniciação é caracterizada por alteração irreversível no DNA e envolve uma cadeia de eventos extra 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).

As células iniciadas não possuem nenhum grau mensurável de proliferação celular autônoma, no entanto, durante a promoção do tumor, o material genético modificado da célula iniciada altera a expressão de genes que regulam a diferenciação e o crescimento celular, resultando em aumento reversível da proliferação e expressão genética das células iniciadas (DRAGAN & PITOT, 1992).

Diferente do estágio de iniciação, a promoção pode ser continuamente modulada por vários fatores ambientais, incluindo a frequência de administração do agente promotor, idade do animal usado no experimento, composição e quantidade de 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 quimiopreventivos do câncer (PITOT & DRAGAN, 1994).

Finalmente, o estágio da progressão é caracterizado por instabilidade genômica e contínua evolução para formação neoplásica. As alterações na estrutura do gene da célula neoplásica durante a progressão estão diretamente relacionadas ao aumento da velocidade de crescimento celular, à capacidade de invasão, ao crescimento autônomo e às alterações bioquímicas nas células malignas. Estas alterações, como reflexo da instabilidade genômica, continuam a evoluir (progredir) durante o estágio de progressão (PITOT & DRAGAN, 1991).

A progressão da célula pré-maligna para maligna é um processo irreversível e ocorre em consequência de dano adicional ao cromossomo, resultando em proliferação celular incontrolada (PITOT & DRAGAN, 1991) devido à reduzida dependência dessas células aos fatores de crescimento, bem como menor capacidade para apoptose (RIZZI et al., 1997).

Desde que SASAKI & YOSHIDA (1935, citado por ESPANDIARI et al., 2005) relataram a indução de câncer hepático com O-amino-azotolueno, o fígado tem se destacado como órgão alvo para estudo das diferentes etapas da carcinogênese química experimental (ESPANDIARI et al., 2005). Estudos sobre a etiologia e

histopatogênese 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).

Em 1974 foi realizado um *workshop* para padronizar a classificação de lesões hepáticas vistas durante a carcinogênese experimental em roedores (SQUIRE & LEVITT, 1975). A classificação recomendada para estas lesões é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação recomendada para lesões hepatocelulares específicas observadas na carcinogênese experimental em roedores.

Focos de alteração celular

Foco de células claras

Foco eosinofílico ou “vidro fosco”

Foco basofílico

Foco de células mistas

Nódulos neoplásicos

Carcinomas hepatocelulares

Bem diferenciado

Moderadamente diferenciado

Pouco diferenciado

Com formação papilar e/ou glandular

De acordo com esta classificação, focos e áreas de alteração celular são lesões constituídas por células com alterações na coloração e textura citoplasmática vistas em cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina. A diferença entre focos e áreas é somente o tamanho ocupado por estas lesões. Os focos são lesões menores do que um lóbulo hepático, enquanto as áreas são lesões de tamanho igual ou superior a um lóbulo hepático. 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 hipercromáticos e com nucléolo aumentado.

Os nódulos neoplásicos são lesões esféricas que geralmente ocupam área equivalente a alguns lóbulos hepáticos e mostram perda da arquitetura normal. Os hepatócitos dentro dos nódulos são similares àqueles vistos nos focos ou áreas e podem mostrar misturas de alterações citoplasmáticas. Algumas vezes estão presentes mitoses e graus variados de atipia nuclear, caracterizados por aumento, hipercromasia, duplicação e nucléolo aumentado. Um aspecto importante do nódulo é a distorção da arquitetura e nítida demarcação do fígado circunjacente. 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 ou dilatação. 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.

Os carcinomas hepatocelulares são lesões maiores e mais irregulares do que os nódulos neoplásicos e podem envolver maiores porções dos lobos. Na periferia eles comprimem ou se estendem dentro do parênquima ao redor. Os carcinomas trabeculares podem ser classificados em bem, moderadamente ou pouco diferenciados, dependendo da sua semelhança com o fígado normal. As células do tumor apresentam-se arranjadas em trabéculas espessas. As várias fileiras de células são desordenadamente arranjadas em padrões linear, papilar ou pseudoacinar. As células do tumor podem ser semelhantes ao hepatócito normal ou estar aumentadas ou anaplásicas nos tumores menos diferenciados. Elas podem estar isoladas do parênquima normal por uma fileira de células. O citoplasma pode ser claro, eosinofílico ou hiperbasofílico e os núcleos são freqüentemente aumentados e hipercromáticos. Núcleos múltiplos e figuras mitóticas podem estar presentes.

Focos de hepatócitos alterados em proliferação são vistos em virtualmente todos os modelos de carcinogênese hepática experimental. Eles 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 e tornando-se nódulos macroscopicamente visíveis (TATEMATSU et al., 1983). Os focos de hepatócitos alterados e nódulos hepáticos hiperplásicos, decorrentes da expansão clonal de hepatócitos iniciados, precedem o aparecimento do tumor e são denominadas lesões pré-neoplásicas (LPN), representando potenciais precursores para os passos subseqüentes no processo de carcinogênico (DRAGAN & PITOT, 1992).

As LPN, embora constituídas de hepatócitos semelhantes morfológicamente aos originais, mostram características relacionadas à bioquímica e histoquímica 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 B-glicuronidase e elevação de outros como γ -glutamiltranseptidase e DT-diaforase (SCHERER & EMMELLOT, 1975; OGAWA et al., 1980).

Uma propriedade característica da hepatocarcinogênese experimental é que a maioria dos focos e nódulos fenotipicamente alterados (93% a 98%) sofrem remodelação para uma aparência de fígado normal num processo muito complexo que envolve estrutura e arquitetura celular, suprimento sangüíneo e propriedades bioquímicas, enquanto um pequeno subgrupo destas LPN persiste e prolifera, podendo progredir para carcinoma hepatocelular (ENOMOTO & FARBER, 1982; TATEMATSU et al., 1983; FARBER & RUBIN, 1991).

Macroscopicamente, durante a remodelação, as LPN branco-acinzentadas adquirem coloração cinza-avermelhada de forma característica, tornando-se menores e mais homogêneas com o parênquima original (TATEMATSU et al., 1983). Por outro lado, as lesões persistentes mantêm colorações branco-acinzentada, sendo facilmente distinguíveis da coloração marrom-avermelhada do fígado original (ENOMOTO & FARBER, 1982).

No processo de remodelação, marcadores histoquímicos previamente negativos para as LPN retornam, enquanto marcadores positivos desaparecem, conferindo à lesão nodular uma descoloração ou coloração não uniforme. Dessa forma, usando coloração histoquímica específica para um marcador positivo ou negativo, é possível verificar que os hepatócitos que constituem as LPN misturam-se com os do parênquima circunjacente, tornando a delimitação da lesão menos definida (ENOMOTO & FARBER, 1982; TATEMATSU et al., 1983).

Os nódulos persistentes mostram arquitetura e padrão histoquímico característicos com duas ou mais fileiras de células e persistência de marcadores fenotípicos positivos ou negativos. Apresentam, microscopicamente, coloração ou descoloração uniforme e compressão do parênquima ao redor, resultando em nítida delimitação do fígado circunjacente em toda sua extensão (ENOMOTO & FARBER, 1982).

Embora as lesões persistentes e de remodelação sejam denominadas pré-neoplásicas, as primeiras são mais importantes com relação ao desenvolvimento posterior do câncer (TEEBOR & BECKER, 1971).

Em humanos, diferentes lesões são observadas em pacientes e populações consideradas de alto risco para o câncer hepático e possivelmente representam condições pré-neoplásicas hepáticas. Estas lesões incluem displasia celular, hiperplasia adenomatosa, focos e nódulos de hepatócitos alterados. Focos de hepatócitos alterados vistos em diferentes doenças hepáticas, de forma semelhante aos vistos na hepatocarcinogênese experimental, são populações de células fenotipicamente alteradas. Estes focos de células são constituídos de células claras com retenção de glicogênio, células basofílicas ou células mistas (SU & BANNASCH, 2003).

Segundo dados revisados por SU & BANNASCH (2003) sobre prevalência e relevância de lesões no fígado cirrótico humano, os focos de hepatócitos alterados foram mais freqüentes em fígados com carcinoma hepatocelular do que naqueles sem carcinoma. Os focos de células mistas, predominantes em fígados cirróticos de grupos de alto-risco para carcinoma hepatocelular, eram maiores, mais proliferativos e mais freqüentemente envolvidos na formação de nódulos do que os focos com retenção de glicogênio. Estes achados sugerem que os focos de células mistas são dotados de maior potencial para progredir para carcinoma hepatocelular em humanos, representando um estágio mais avançado na carcinogênese hepática.

2.4 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS

Alterações no padrão bioquímico celular são eventos primários na formação de carcinomas hepatocelulares induzidos em ratos. Assim, diferentes enzimas têm sido usadas como marcadores histoquímicos e/ou imunohistoquímicos de LPN em modelos de tumores hepáticos, entre as quais encontram-se a γ -

glutamyltranspeptidase e a glicose-6-fosfatase (KITAGAWA & PITOT, 1975; GARCEA et al., 1989; SÁNCHEZ-PÉREZ et al., 2005).

A γ -glutamyltranspeptidase (GGT) é uma glicoproteína localizada sobre a superfície externa da membrana celular. Ela foi primeiramente descrita como a enzima que catalisa a transferência do grupo γ -glutamil da glutathione para um aminoácido receptor, num processo denominado transpeptidação (HANES & HIRD, 1950).

A glutathione é um tripeptídeo composto de cisteína, ácido glutâmico e glicina que ocorre em todas as células vivas. No entanto, não podendo atravessar a membrana celular, a glutathione necessita ser hidrolisada em seus aminoácidos constituintes. Visto que a presença do grupo γ -glutamil torna a glutathione resistente a ação de proteases, a GGT é a única enzima que pode clivar a glutathione intacta (HANIGAN & PITOT, 1985).

Em humanos, a GGT é expressa sobre a superfície luminal de glândulas do endocérvix, endométrio e adrenais. Encontra-se em elevada concentração sobre a superfície luminal dos túbulos proximais no rim, canalículo biliar hepático e células do endotélio capilar dentro do sistema nervoso. A GGT também está presente em células secretoras ou absorptivas nas glândulas sudoríparas, próstata, ductos das glândulas salivares, ducto biliar, ácino pancreático, criptas intestinais e túbulos testiculares (HANIGAN & FRIERSON-JR, 1996). A presença da GGT na superfície de glândulas e ductos permite a reabsorção pelas células dos aminoácidos constituintes da glutathione a partir dos fluidos que estão sendo excretados, funcionando como mecanismo para retenção destes aminoácidos dentro do corpo (HANIGAN, 1998).

A observação de que altos níveis de GGT ocorrem em tumores de diferentes tecidos em mamíferos, dentre os quais o carcinoma hepatocelular, levou HANIGAN & PITOT (1985) a propor que os hepatócitos com níveis aumentados de GGT têm vantagem seletiva sobre aqueles GGT-negativos em ambiente tóxico criado pelos regimes hepatocarcinogênicos, ou seja, quando o animal é tratado com carcinógenos ou agentes promotores que depletam a glutathione intracelular. A GGT sobre a superfície do hepatócito hidrolisaria a glutathione sérica, provendo a célula com os aminoácidos necessários para a reposição da glutathione intracelular.

A glicose-6-fosfatase (G6Pase) é uma proteína hidrofóbica e consiste em um sistema de multiproteínas localizado principalmente no retículo endoplasmático da membrana celular. Seu sítio ativo está voltado para a face luminal do retículo, fazendo necessário que seus substratos e produtos de reação atravessem a bicamada fosfolipídica do retículo endoplasmático (CLOTTE et al., 2002). Sua atividade hidrolítica é encontrada principalmente no rim e no fígado, onde desempenha função chave na homeostase da glicose, catalisando o passo terminal em ambas gliconeogênese e glicogenólise. A enzima hidrolisa a glicose-6-fosfato a glicose e fosfato inorgânico, garantindo a liberação da glicose na corrente sanguínea quando ocorrem baixos níveis de glicose sérica (JANECKE et al., 2001).

A análise histoquímica em cortes congelados de fígado mostra atividade da G6Pase somente no citoplasma dos hepatócitos, não sendo demonstrado em vasos sanguíneos, tecido conjuntivo, canalículo biliar ou célula de Kupffer (CHIQUOINE, 1953). Os hepatócitos que constituem as LPN apresentam deficiência na atividade de G6Pase, sendo esta utilizada como marcador bioquímico negativo para tais lesões (OGAWA et al., 1980).

2.5 MODELO HEPATÓCITO RESISTENTE

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) na dieta e estímulo mitogênico, como a HP.

Considerando que os hepatocarcinógenos inibem a proliferação celular pós-hepatectomia 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 HP. Dessa forma, o crescimento seletivo de hepatócitos iniciados resultaria de sua relativa resistência à ação citotóxica de carcinógenos hepáticos associado à criação de ambiente para a sua proliferação (SOLT & FARBER, 1976).

Acredita-se que o carcinógeno iniciador induza em alguns hepatócitos novas propriedades relacionadas ao metabolismo e aos efeitos tóxicos de carcinógenos hepáticos e de toxinas que requerem ativação metabólica, passando a ter potencial

de crescimento superior à maioria dos hepatócito originais quando em ambiente citotóxico (SOLT & FARBER, 1976). Este padrão metabólico alterado inclui resistência à morte celular induzida por toxinas hepáticas e capacidade de proliferação após HP durante a administração de carcinógeno. Os hepatócitos resistentes apresentam também redução em alguns constituintes da FASE I do metabolismo de xenobióticos, incluindo enzimas do citocromo P450 e em algumas monooxigenases de função mista, resultando em diminuição na ativação de alguns carcinógenos e aumento em alguns sistemas de conjugação da FASE II (FARBER & RUBIN, 1991).

Algumas vantagens em relação aos demais modelos de hepatocarcinogênese experimental têm sido descritas para o modelo HR. Com a inibição da proliferação de quase todos os hepatócitos pelo 2-AAF, somente os hepatócitos resistentes (iniciados) respondem ao estímulo mitogênico da HP. Eles 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 totalmente sincronizados de forma que muitos nódulos aparecem e crescem como um grupo (OGAWA et al., 1980). Este sincronismo dos estágios da carcinogênese hepática permite análise seqüencial do processo (ENOMOTO & FARBER, 1982; TATEMATSU et al., 1983).

Estudos realizados por OGAWA et al. (1980) e ENOMOTO & FARBER (1982) mostraram que neste modelo é possível distinguir muito precoce e facilmente os nódulos persistentes dos de remodelação com o uso de coloração histoquímica. Dessa forma, as LPN podem ser analisadas qualitativa e quantitativamente.

Em adição, tem sido descrito que esse protocolo de hepatocarcinogênese em ratos é particularmente adaptado para avaliar os efeitos de compostos potencialmente capazes de modular o processo carcinogênico (MORENO et al., 1995).

2.6 ALIMENTOS FUNCIONAIS E QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER

O câncer é um problema crescente no mundo inteiro. Com o aumento na expectativa de vida, aumento da urbanização e alterações no estilo de vida, a

incidência mundial de câncer estimada em 11 milhões em 2002 atingirá mais de 15 milhões de novos casos em 2020 (BRASIL, 2006).

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. Esta compreensão é essencial na definição de ações efetivas de prevenção da doença (BRASIL, 2006).

Diferentes estudos demonstram que as incidências regionais do câncer estão diretamente relacionadas aos hábitos de vida e especialmente com a alimentação (LOPES et al., 1984; SICHERI et al., 1996; RODRIGUEZ et al., 2004). Estima-se que mais de dois terços dos cânceres em humanos estejam relacionados à dieta e podem ser prevenidos por modificação no estilo de vida (SURH, 2003).

O maior consumo de frutas e vegetais pode reduzir o risco de diferentes tipos de câncer, doenças cardíacas e outras doenças crônicas relacionadas à idade (HEBER, 2004). Em adição, vários protetores contra a carcinogênese química experimental identificados até o momento são compostos químicos encontrados naturalmente em alimentos ou constituintes da dieta (RIZZI et al., 1997; SHAMAAN et al., 1998; SAHA et al., 2001).

A quimioprevenção do câncer pode ser definida como uma forma de prevenir a doença pelo uso de um ou mais compostos químicos capazes de bloquear ou reverter o estágio pré-maligno (iniciação e promoção) da carcinogênese. Compostos quimiopreventivos seriam também aqueles capazes de interromper ou, ao menos, retardar o desenvolvimento e progressão das células pré-cancerosas para malignas (SURH, 2003).

De acordo com WATTENBERG (1985), os agentes quimiopreventivos podem ser classificados em duas categorias principais: agentes bloqueadores e agentes supressores. Os agentes bloqueadores são aqueles capazes de prevenir a ocorrência de dano ao DNA, inibindo a ativação metabólica dos pró-carcinógenos em espécies eletrofílicas ou sua subsequente interação com macromoléculas celulares, como DNA, RNA e proteínas. São também classificados como agentes bloqueadores, substâncias que estimulam a desintoxicação dos carcinógenos, levando à sua excreção mais rápida pelo organismo, antioxidantes que inativam os radicais livres e compostos químicos que capturam o carcinógeno ativado. Os agentes supressores, por outro lado, inibem a transformação maligna das células

iniciadas nos estágios de promoção e de progressão da carcinogênese. Geralmente, a atividade quimiopreventiva destes agentes é atribuída à sua influência sobre a proliferação e diferenciação celular e/ou apoptose. Alguns agentes quimiopreventivos podem agir tanto como bloqueadores quanto como supressores.

Sob esta perspectiva encontram-se os alimentos funcionais, que são alimentos ou constituintes de um alimento que ingeridos diariamente em determinadas quantidades mostram potencial para modificar o metabolismo e/ou fisiologia de maneira favorável à prevenção do câncer e de outras doenças crônico-degenerativas como hipertensão, diabetes, coronariopatias e osteoporose (ANJO, 2004).

Alguns aspectos devem ser levados em consideração em relação aos alimentos funcionais. Segundo ROBERFROID (2002), além do valor nutritivo inerente à sua composição química, eles devem exercer efeitos metabólicos ou fisiológicos positivos, contribuindo para o bem-estar e a saúde e/ou reduzindo o risco de ocorrência de doenças. Devem ser consumidos na dieta usual, podendo ser um alimento natural ou um alimento no qual um componente ativo tenha sido adicionado ou retirado. Pode também ser um alimento cuja natureza e/ou bioatividade de um ou mais componentes tenha sido modificada. Em adição, a alegação da propriedade funcional deve ter embasamento científico.

2.7 CAFÉ 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 arábica* L. e *Coffea canephora pierre*, conhecidas como café arábica e café robusta, respectivamente (ABIC, 2005).

Estima-se que o café tenha sido descoberto há mais de mil anos no Oriente Médio, quando um pastor etíope observou que suas cabras tornavam-se mais espertas e resistentes após comerem uma pequena cereja, o fruto do cafeeiro. Os árabes foram os primeiros a cultivar o café e a usá-lo como bebida, por isso o nome científico *Coffea arabica*. Embora os árabes tenham tomado certas medidas para manter o monopólio da produção de café, os holandeses conseguiram contrabandear frutos frescos e, graças a eles, o café começou a ser conhecido pelo mundo. Por intermédio de comerciantes venezianos o café foi levado para a Europa

em 1615, onde passou a ser utilizado como bebida, principalmente devido à crença difundida de que possuía qualidades medicinais. Dessa forma o café foi rapidamente disseminado pelos continentes, chegando ao continente americano em 1668 e tornando-se uma das bebidas mais aceitas pela população de grande número de países. O produto só chegou ao Brasil em 1727, sendo cultivado no 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 (ICO, 2005).

Ainda hoje, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor, atrás apenas dos Estados Unidos (ABIC, 2005). 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; PERFECTO et al., 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 15 bilhões de dólares (ABIC, 2005).

O alto consumo mundial do produto tem estimulado o desenvolvimento de estudos relacionados à atividade biológica do grão e de constituintes do café verde e, especialmente, do café torrado que é utilizado para preparar diferentes tipos de bebidas. Alguns dos principais compostos presentes nos grãos de café verdes e torrados são apresentados na Tabela 2.

Em ordem de abundância, os constituintes do café torrado solúveis em água são: polímeros fenólicos 8%, polissacarídeos 6%, ácidos clorogênicos 4%, minerais 3%, cafeína 1%, ácidos orgânicos 0,5%, açúcares 0,3%, lipídeos 0,2% e compostos aromáticos 0,1% (CLARKE & MACRAE, 1989 citado por ABREU, 2005).

Diferentes constituintes do café 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 (MONTEIRO & TRUGO, 2005) e são de grande interesse econômico devido a sua degradação, durante a torrefação, em compostos responsáveis pelo sabor e aroma da bebida (LELOUP et al., 1995). Eles compreendem uma família de compostos formados pela esterificação do ácido

quínico com um ou mais derivados do ácido cinâmico, como o ácido caféico, ácido ferúlico e ácido ρ -cumárico (DE MARIA & MOREIRA, 2004).

Tabela 2 - Composição centesimal dos grãos de café verdes e torrados

Componentes (%)	Café Arábica		Café Robusta	
	Verde	Torrado	Verde	Torrado
Minerais	3,0 – 4,2	3,5 - 4,5	4,0 - 4,5	4,6 - 5,0
Cafeína	0,9 – 1,2	1,0	1,6 - 2,4	2,0
Trigonelina	1,0 – 1,2	0,5 - 1,0	0,6 - 0,8	0,3 - 0,6
Lipídeos	12,0 - 18,0	14,5 - 20,0	9,0 - 13,0	11,0 - 16,0
Ácidos clorogênicos	5,5 – 8,0	1,2 - 2,3	7,0 - 10,0	3,9 - 4,6
Ácidos alifáticos	1,5 – 2,0	1,0 - 1,5	1,5 - 2,0	1,0 - 1,5
Oligossacarídeos	6,0 – 8,0	0 - 3,5	5,0 - 7,0	0 - 3,5
Polissacarídeos totais	50,0 - 55,0	24,0 - 39,0	37,0 - 47,0	-
Aminoácidos	2,0	0	2,0	0
Proteínas	11,0 - 13,0	13,0 - 15,0	11,0 - 13,0	13,0 - 15,0

Fonte: PATARROYO, 2003 citado por MIZUBUTI, 2006.

No tratamento térmico do grão ocorre degradação parcial de polifenóis de ocorrência natural no café, mas favorece a formação, principalmente na reação do Maillard, de outros compostos com potente atividade antioxidante (DAGLIA et al., 2004; YANAGIMOTO et al., 2004). Os compostos heterocíclicos voláteis 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 α -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).

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, inodor e com

sabor amargo bastante característico que contribui de forma importante para o sabor e aroma do café (MONTEIRO & TRUGO, 2005). Seu consumo de 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, 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 no café como bebida. A concentração destes compostos na bebida depende fortemente do procedimento 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 aductos 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 do citocromo P450, com conseqüente 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 glutathione S-transferase e UDP-glicuronosil transferases (HUBER et al., 2002_a; HUBER et al., 2003). O cafeol e cafestol também aumentam os teores de glutathione, o cofator da desintoxicação relacionada a glutathione S-transferase, e de γ -glutamylcisteína-sintetase, a enzima limitante da síntese de glutathione (HUBER et al., 2002_b; HUBER et al., 2003).

Diversos estudos epidemiológicos mostram relação inversa entre o consumo de café e o risco de câncer em diferentes órgãos como pulmão (MENDILAHARSU et

al., 1998), mama (MICHELS et al., 2002), faringe, esôfago (TAVANI et al., 2003) e fígado (GELATTI et al., 2005).

O consumo de café está também associado com redução nos níveis séricos de GGT e aminotransferases em consumidores de bebidas alcoólicas, sugerindo que o café inibe a indução da GGT no fígado pelo consumo de álcool e possivelmente protege contra o dano celular hepático devido ao consumo de álcool (TANAKA et al., 1998). Estudo posterior realizado por CORRAO et al. (2001) mostrou relação inversa dose-efeito entre o consumo de café e o risco de cirrose hepática, sugerindo que o café poderia inibir o início da cirrose hepática em pacientes alcoolistas e não-alcoolistas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

Banho com agitação e temperatura regulável Yamato modelo BT-25 (Tóquio, Japão). Centrífuga refrigerada Hitachi modelo CR-21 (Hitachinaka, Japão). Criostato Microm-Zeiss modelo HM-500 (Walldorf, Alemanha). Espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001 (Hitachinaka, Japão). Estufa de esterilização e secagem Nova Ética modelo 420-D (SP, Brasil). Liofilizador Edwards modelo L4KR (Londres, Inglaterra). Micro-moinho tipo Willye Tecnal modelo Te-648 (SP, Brasil). Microscópio ótico binocular Olympus modelo CBB (SP, Brasil). Sistema de captura de imagem constituído de lupa estereoscópio Zeiss-Stemi modelo 2000-C, câmera CCD Fujitsu TCZ 984-P e programa Microsoft Office Picture Manager®. Programa de análise de imagens Image Tool (Universidade do Texas, versão 3,00 – “freeware”).

4.2 REAGENTES QUÍMICOS

O 2-AAF foi adquirido da Acros Organics (New Jersey, USA); a *L*- γ -glutamil-*p*-nitroanilida foi adquirida da MP Biomedicals (Ohio, USA); a DEN e a glicose-6-fosfato de sódio foram adquiridas da Sigma Chemical CO (MO, USA).

Todos demais reagentes usados apresentaram o mais alto grau de pureza comercialmente disponível.

4.3 CARACTERIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DO CAFÉ

Foi utilizado café da espécie *Coffea arabica*, torrado e moído, adquirido de estabelecimento de torrefação do Sul de Minas. 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 uma temperatura de 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.

A extração do café foi realizada de acordo com VITORINO et al. (2001) com algumas modificações. Um volume de 1000 mL de água destilada foi aquecido em chapa elétrica até 90°C e vertido lentamente sobre 60 g da amostra do café moído. Após agitação por dois minutos, a suspensão foi colocada em banho à temperatura ambiente por 10 minutos. O extrato foi então centrifugado (Centrífuga refrigerada Hitachi, modelo CR-21, Hitachinaka, Japão) a 27 x g por 10 min a 8°C e o sobrenadante liofilizado (Liofilizador Edwards, modelo L4KR, Londres, Inglaterra).

4.4 PREPARO DAS DIETAS

O preparo das dietas foi realizado por adaptação da técnica utilizada por PAOLINELLI (2002). As rações Labina® (Purina, SP, Brasil) e Bonzo - Carne, frango e ossinhos® (Purina, SP, Brasil) foram previamente moídas (micro-moinho tipo Willye Tecnal, modelo Te-648, 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 contendo 4% de gelatina em pó, 1% de amido de milho e 5% de açúcar refinado, previamente dissolvidos a quente. Depois de homogeneizada, a massa resultante foi cortada em pequenos pedaços e secada à 60°C em estufa com circulação forçada de ar (Estufa de esterilização e secagem Nova Ética, modelo, 420-D, SP, Brasil). Esta recebeu o nome de dieta controle.

A dieta café teve por base a ração controle adicionada de café liofilizado numa concentração de 1,5%. A composição nutricional centesimal e o valor calórico das dietas são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - 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 química é a constante dos rótulos dos produtos comerciais utilizados, adicionada dos ingredientes utilizados para a preparação das dietas.

4.5 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 135/05.

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, logo após o parto, as fêmeas, com os respectivos filhotes, foram aleatoriamente separadas em dois grupos. Um grupo, denominado Matrizes Controle, foi formado por cinco fêmeas que receberam dieta controle ao longo do período de lactação. O segundo grupo, denominado Matrizes Café, foi formado por cinco fêmeas que receberam dieta café durante o período de lactação. O número de filhotes por matriz foi fixado em oito.

Aos 21 dias de vida os filhotes foram desmamados e somente os filhotes machos foram mantidos no experimento. Vinte filhotes machos de cada grupo (Matrizes Controle e Matrizes Café), selecionados aleatoriamente, foram alocados em gaiolas individuais e passaram a receber a mesma dieta oferecida para a respectiva fêmea matriz, constituindo dois grupos denominados Grupo Controle e Grupo Café.

No 42º dia de vida, os animais do Grupo Controle e Grupo Café foram subdivididos: a metade dos animais de cada grupo seria submetida somente à HP, enquanto a outra metade dos dois grupos seria submetida ao modelo de hepatocarcinogênese HR. Dessa forma, obtiveram-se quatro grupos com 10 animais:

- **Grupo Controle (CO):** alimentado com dieta controle e submetido à HP;
- **Grupo Controle CA (CO CA):** alimentado com dieta controle e submetido ao modelo HR;
- **Grupo Café (Café):** alimentado com dieta suplementada com 1,5% de café liofilizado e submetido à HP;
- **Grupo Café CA (Café CA):** alimentado com dieta suplementada com 1,5% de café liofilizado e submetido ao modelo HR. O esquema de formação dos grupos experimentais está representado na Figura 1.

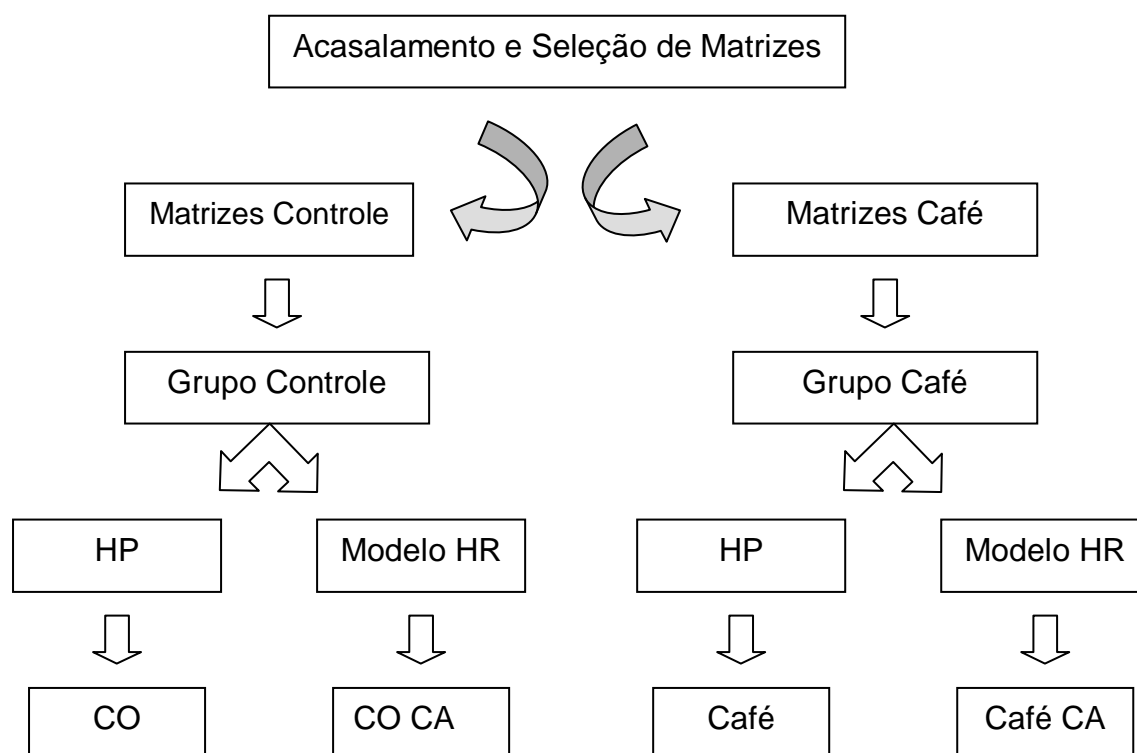


Figura 1 - Apresentação esquemática do desenho experimental. HR - hepatócito resistente; HP - hepatectomia parcial. CO - grupo que recebeu dieta controle e foi submetido à HP; Café - grupo que recebeu dieta suplementada com café e foi submetido à HP; CO CA - grupo que recebeu dieta controle e foi submetido ao modelo HR; Café CA - grupo que recebeu dieta suplementada com café e foi submetido ao modelo HR.

4.6 INDUÇÃO DA HEPATOCARCINOGENESE

A indução da hepatocarcinogênese foi adaptada de SOLT & FARBER (1976). A iniciação ocorreu no 42º dia de vida dos animais por injeção intra-peritoneal de dose única de DEN (Sigma Chemical CO, MO, USA) 200 mg/Kg de peso corporal em solução salina 0,9% (100 mg/mL).

Dezessete dias após a iniciação, os animais receberam durante quatro dias consecutivos, via gavagem, 2-AAF (Acros Organics, New Jersey, USA), 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, uma dose adicional de 20 mg/Kg de peso corporal de 2-AAF foi novamente administrada. O protocolo de indução da hepatocarcinogênese é apresentado de forma esquemática na Figura 2.

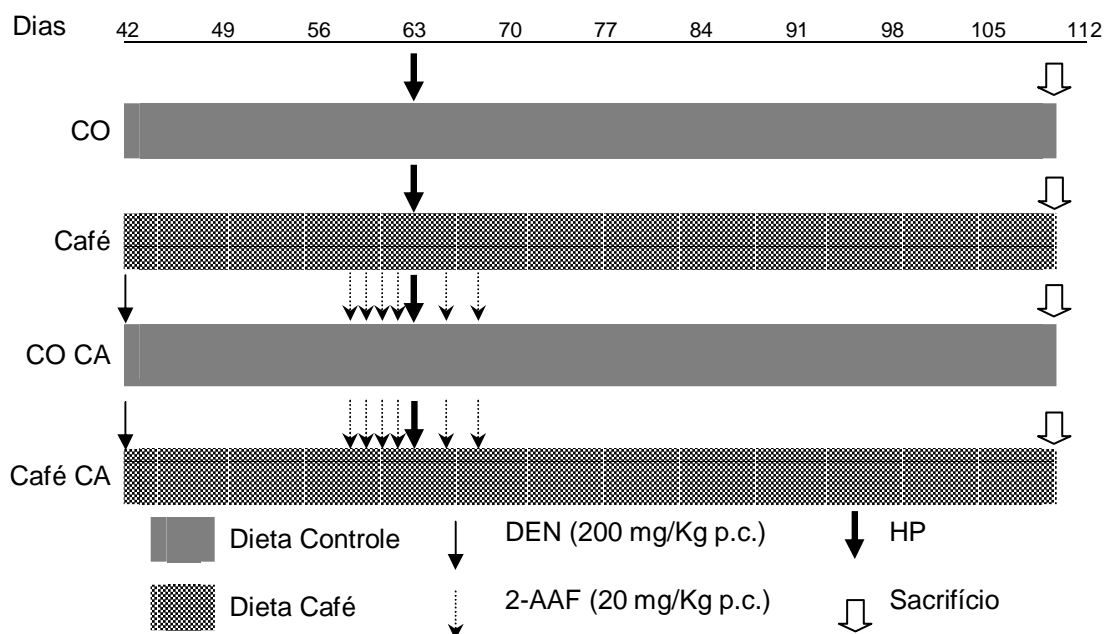


Figura 2 - Apresentação esquemática do protocolo de indução da hepatocarcinogênese.

Os grupos de animais submetidos somente à HP receberam no 42º dia de vida 0,35 mL de solução salina 0,9% e, nos dias correspondentes à administração de 2-AAF aos grupos submetidos à indução de câncer, receberam 1,0 mL de propilenoglicol, via gavagem.

Todos os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina com aproximadamente 110 dias de vida.

4.7 HEPATECTOMIA PARCIAL

Os animais foram submetidos à HP no 63º dia de vida. Para a anestesia foi utilizada uma 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 na ramificação comum aos lobos médio e lateral esquerdo, utilizando-se fio de sutura

estéril absorvível Catigut 4-0. Seccionaram-se os 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.

No primeiro dia pós-operatório foi oferecida aos animais solução de sacarose 20% como fonte calórica e após este período os animais receberam água e dieta normalmente.

4.8 PESO CORPORAL E REGENERAÇÃO HEPÁTICA

Para avaliação da regeneração hepática, foram sacrificados 10 ratos da raça Wistar com idade média de 63 dias 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.

Os animais experimentais foram pesados com 63 dias de vida, data da HP, e na data do sacrifício. O peso do fígado dos animais experimentais na data da hepatectomia foi estimado pela média dos valores calculados a partir das constantes K_1 e K_2 , do peso dos lobos seccionados e do peso dos animais na data da HP.

4.9 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

Após o sacrifício dos animais, os fígados foram removidos, secados em papel filtro e pesados. Um fragmento representativo do lobo lateral direito, no qual foi encontrado o maior número de lesões macroscopicamente visíveis, foi colocado em solução de sacarose 30% em tampão fosfato 0,1 M. Após um período de três horas mantidos a 4°C, os fragmentos foram congelados em criostato (Criostato Microm-

Zeiss, modelo HM-500, Walldorf, Alemanha) a -18°C , onde confeccionaram-se cortes de $10\ \mu\text{m}$ de espessura.

Para cada animal, foram preparadas cinco lâminas com três cortes histológicos. Uma lâmina foi corada pela hematoxilina e eosina e a subsequente foi submetida à reação de histoquímica para a G6Pase, de acordo com a metodologia de WACHSTEIN & MEISEL (1956). As demais lâminas foram mantidas a -80°C para eventual utilização.

Para a reação histoquímica, as lâminas foram mergulhadas em tampão Tris-HCl $0,2\ \text{M}$ pH $6,7$ por cinco minutos. Posteriormente as lâminas foram incubadas em uma solução que consistia de $20\ \text{mL}$ de solução de glicose-6-fosfato de sódio $263,4\ \text{mg}\%$ (Sigma Chemical CO, MO, USA), $20\ \text{mL}$ de tampão Tris-HCl $0,2\ \text{M}$ pH $6,7$, $3\ \text{mL}$ de solução de nitrato de chumbo 2% e $7\ \text{mL}$ de água destilada. Após incubação por 30 minutos a 32°C , as lâminas foram lavadas em tampão Tris-HCl $0,2\ \text{M}$ pH $6,7$, colocadas em solução de sulfeto de amônia 4% por cinco minutos, novamente lavadas e fixadas em formalina neutra 6% por 10 minutos. As lâminas foram então desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico e montadas com resina sintética.

A localização intracelular da G6Pase na microscopia ótica é indicada pela formação de sulfeto de chumbo em locais de atividade da enzima (CHIUQUINE, 1953). Durante a incubação, a enzima hidrolisa a glicose-6-fosfato liberando íons fosfato que reagem com o nitrato de chumbo e formam precipitado insolúvel e incolor de fosfato de chumbo. Este precipitado reage com o sulfeto de amônia formando precipitado negro de sulfeto de chumbo.

Em cada lâmina, todos os cortes histológicos foram examinados em toda sua extensão em microscópio ótico (Microscópio ótico binocular Olympus, modelo CBB, SP, Brasil), procurando-se focos ou nódulos de hepatócitos descolorados. As imagens foram capturadas somente após a confirmação da reprodutibilidade das lesões em todos os cortes da lâmina, evitando-se, portanto, a captura de possíveis artefatos de coloração.

As imagens dos cortes histológicos contendo as LPN foram capturadas em aumento de $0,8x$ e $3,2x$, usando-se sistema de captura constituído de lupa esterioscópico Zeiss-Stemi modelo 2000-C, câmera CCD Fujitsu TCZ 984-P e programa Microsoft Office Picture Manager®.

A partir da imagem capturada, prosseguiu-se a análise morfométrica (em aumento de 3,2x) das LPN negativas para G6Pase. As LPN foram contadas e classificadas como persistentes ou de remodelação de acordo com o padrão de coloração para a G6Pase (OGAWA et al., 1980). Foram classificadas como persistentes as lesões que apresentaram coloração negativa uniforme, com perda de coloração total dos hepatócitos, ou quando mais de 60% dos hepatócitos apresentaram-se descorados. Consideraram-se lesões de remodelação aquelas que apresentaram coloração negativa não uniforme, correspondendo a cerca de mais de 60% dos hepatócitos corados.

Para o cálculo da área de cada lesão foi utilizado o programa Image Tool (Universidade do Texas, versão 3,00 – “freeware”). A confirmação do limite da área a ser medida em cada lesão foi realizada a partir da comparação da imagem capturada e da lâmina vista em microscópio ótico (Microscópio ótico binocular Olympus, modelo CBB, SP, Brasil), simultaneamente. Nas lesões persistentes, o limite apresentou-se bem demarcado em relação ao parênquima circunjacente, enquanto nos nódulos de remodelação considerou-se como limite os hepatócitos que apresentaram perda de coloração total ou parcial em relação ao parênquima circunjacente. Os resultados foram expressos como número e área de LPN por cm² /corte histológico de fígado.

4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA γ -GLUTAMILTRANSPEPTIDASE

A determinação da atividade da GGT foi realizada de acordo com a metodologia de TATE & MEISTER (1974). Um homogeneizado do tecido foi preparado na concentração de 1:100 em solução salina 0,9%. Alíquotas de 100 μ L da amostra foram colocadas em tubos de ensaio em triplicata. Adicionaram-se 900 μ L de solução de incubação contendo: 0,05 M de tampão Tris-HCl (pH 8), 75 mM NaCl, 2,5 mM *L*- γ -glutamil-*p*-nitroanilida (MP Biomedicals, Ohio, USA), 20 mM glicilglicina. Após incubação por 30 minutos em banho aquecido (Banho com agitação e temperatura regulável Yamato, modelo BT-25, Tóquio, Japão) à 37°C, adicionaram-se 1000 μ L de acetato de sódio 1 M pH 4,2 para interromper a reação. A atividade da enzima foi avaliada pela formação do produto *p*-nitroanilina (nmoles/mg de proteína) por minuto, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de

8.800 $M^{-1}cm^{-1}$ para o produto. A *p*-nitroanilina formada foi lida em 410 nm em espectrofotômetro (Espectrofotômetro Hitachi, modelo U-2100, Hitachinaka, Japão).

Nesta reação a GGT catalisa a transferência de um grupo γ -glutamil entre duas moléculas de γ -glutamil-*p*-nitroanilida, formando γ -glutamil- γ -glutamil-*p*-nitroanilida e *p*-nitroanilina.

4.11 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

O teor de proteína foi determinado pelo método de LOWRY et al. (1951), modificado por HARTREE (1972), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. Um homogeneizado do tecido foi preparado na concentração de 1:10 em solução salina 0,9%. Adicionaram-se 500 μ L deste homogeneizado a 3,0 mL de NaOH 1N, seguindo-se uma incubação por uma hora em banho aquecido (Banho com agitação e temperatura regulável Yamato, modelo BT-25, Tóquio, Japão) à 50°C.

Após atingir temperatura ambiente, 10 μ L da amostra foram colocados em tubos de ensaio em duplicata e adicionada água destilada para um volume final de 1,0 mL. Foi adicionado a cada tubo um volume de 0,9 mL de uma solução A (tartarato de sódio e potássio 0,2%, carbonato de sódio 10% e NaOH 0,5 N), seguido de uma incubação por 10 minutos em banho a 50°C. Após atingir temperatura ambiente, foi adicionado um volume de 0,1 mL da solução B (tartarato de sódio e potássio 2%, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1% e NaOH 0,01 N), mantendo os tubos em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 3,0 mL da solução C (1 volume de Folin-Ciocalteu 2 N para cada 15 volumes de água destilada), seguindo-se novamente incubação por 10 minutos em banho a 50°C. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Espectrofotômetro Hitachi, modelo U-2100, 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. A coloração é intensificada pela reação com o reagente de fenol Folin, permitindo leitura no espectrofotômetro.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Foi realizado o teste de normalidade de FILLIBEN (1975) para todas as variáveis do estudo para a escolha do teste estatístico mais adequado. Para aquelas que apresentaram distribuição normal sobre a Curva de Gauss foi utilizada análise de variância e comparação de médias pelo teste de DUNCAN (1955). Para as demais se utilizou o teste de MANN & WHITNEY (1947).

Estabeleceu-se como nível de rejeição para a hipótese de nulidade p -valores inferiores a 0,05. Os resultados foram apresentados como média e erro padrão da média.

5 RESULTADOS

5.1 PESO CORPORAL, PESO DO FÍGADO E REGENERAÇÃO HEPÁTICA

Os valores de peso corporal na data do sacrifício, ganho de peso corporal pós-hepatectomia, peso do fígado na data da hepatectomia e do sacrifício e regeneração hepática são apresentados na Tabela 4. A ingestão de café e a indução da carcinogênese não alteraram o peso corporal na data do sacrifício, o ganho de peso corporal após a HP, bem como o peso do fígado na data da HP, o peso do fígado regenerado e a regeneração hepática.

Tabela 4 - Peso corporal, ganho de peso corporal pós-hepatectomia, peso do fígado e regeneração hepática

Grupos	CO	Café	CO CA	Café CA
Nº de animais	10	10	9	8
Peso corporal no sacrifício	426,64 ± 10,20 ^a	412,98 ± 14,53 ^a	403,56 ± 12,31 ^a	402,13 ± 12,27 ^a
Ganho de peso corporal pós-hepatectomia ¹	126,86 ± 6,73 ^a	136,77 ± 11,19 ^a	127,60 ± 12,59 ^a	141,56 ± 10,74 ^a
Peso do fígado na data da HP	11,56 ± 0,38 ^a	10,93 ± 0,38 ^a	10,70 ± 0,41 ^a	10,64 ± 0,36 ^a
Peso do fígado regenerado	12,50 ± 0,60 ^a	13,29 ± 0,41 ^a	13,36 ± 1,31 ^a	12,49 ± 0,48 ^a
Regeneração hepática (%)	108,59 ± 4,96 ^a	122,33 ± 3,76 ^a	126,39 ± 12,40 ^a	117,59 ± 3,08 ^a

¹ Ganho de peso corporal da data da hepatectomia até a data do sacrifício. CO - grupo que recebeu dieta controle e foi submetido à HP; Café - grupo que recebeu dieta suplementada com café e foi submetido à HP; CO CA - grupo que recebeu dieta controle e foi submetido ao modelo HR; Café CA - grupo que recebeu dieta suplementada com café e foi submetido ao modelo HR. Letras sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Duncan.

5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

5.2.1 Análise macroscópica

Na análise macroscópica do fígado dos animais submetidos somente à HP não foram observadas LPN. Por outro lado, nos animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese HR observaram-se lesões com variação no número, tamanho e intensidade de coloração. A Figura 3 mostra o fígado de rato da raça Wistar submetido ao modelo de hepatocarcinogênese HR com as mesmas características observadas macroscopicamente nos animais deste estudo.

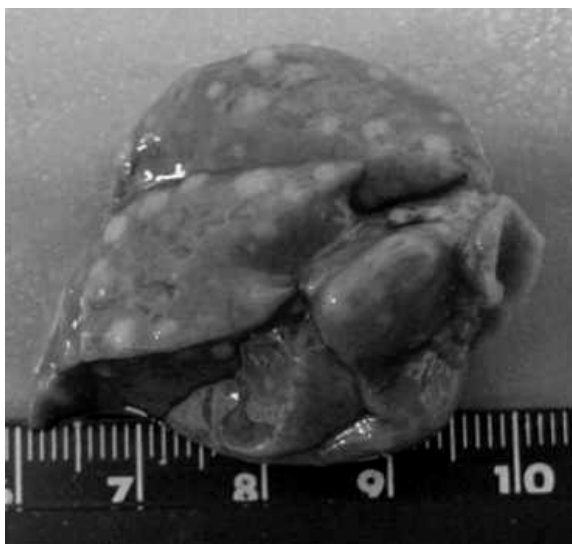


Figura 3 - Fotografia de fígado de animal submetido ao modelo HR (ONG, 2005).

5.2.2 Análise microscópica

Os cortes histológicos do fígado corados pela HE dos animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese HR mostraram alteração parcial da arquitetura hepática devido a presença de nódulos. Estes se apresentavam geralmente de forma esférica, de tamanhos variados e, algumas vezes, demarcados do parênquima circunjacente 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.

Nos cortes histológicos corados pela técnica histoquímica para G6Pase dos animais dos grupos submetidos somente à HP (Figura 4), confirmando a análise macroscópica, não foi observada nenhuma LPN, diferentemente do que foi verificado nos cortes histológicos dos animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese HR (Figura 5). Estes mostraram LPN com variação quanto ao número, à dimensão e à intensidade da coloração dos hepatócitos. As Figuras 6A e 6B ilustram nódulos persistentes e de remodelação observados em animal do grupo Controle CA.

Para garantir a reprodutibilidade da classificação das LPN em persistentes e de remodelação, 43,5% dos casos foram revisados pela co-orientadora do trabalho, constatando-se uma concordância em 97,1% das amostras, em relação à classificação feita pela aluna.

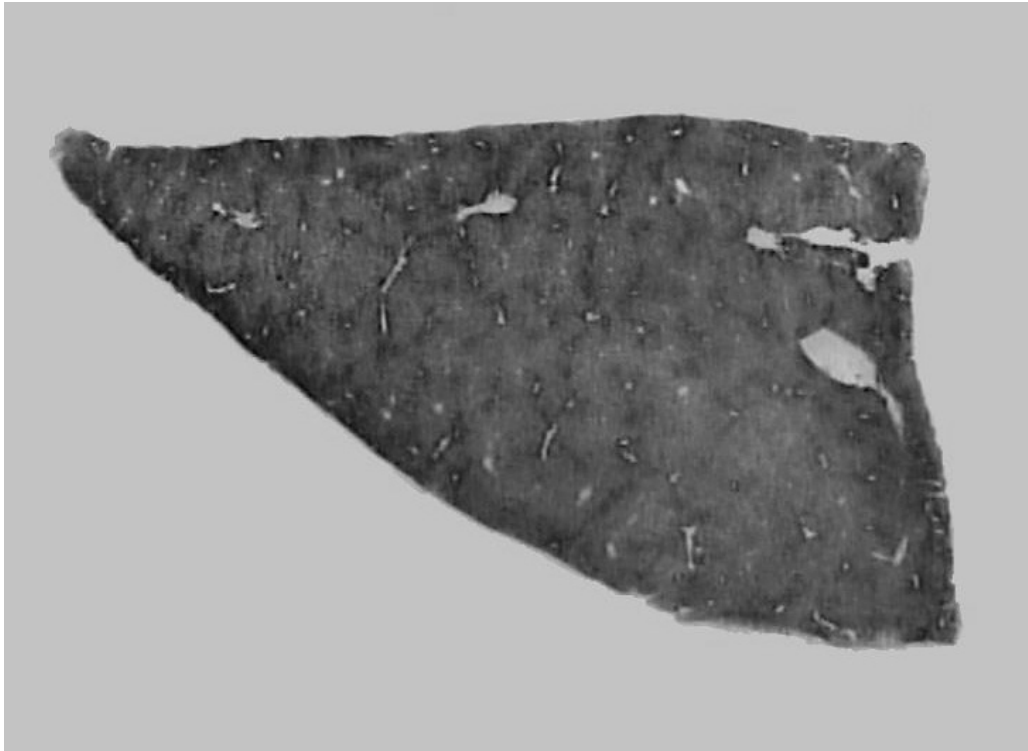


Figura 4 - Fotomicrografia de corte histológico de fígado corado pela reação histoquímica para G6Pase de animal submetido à HP.

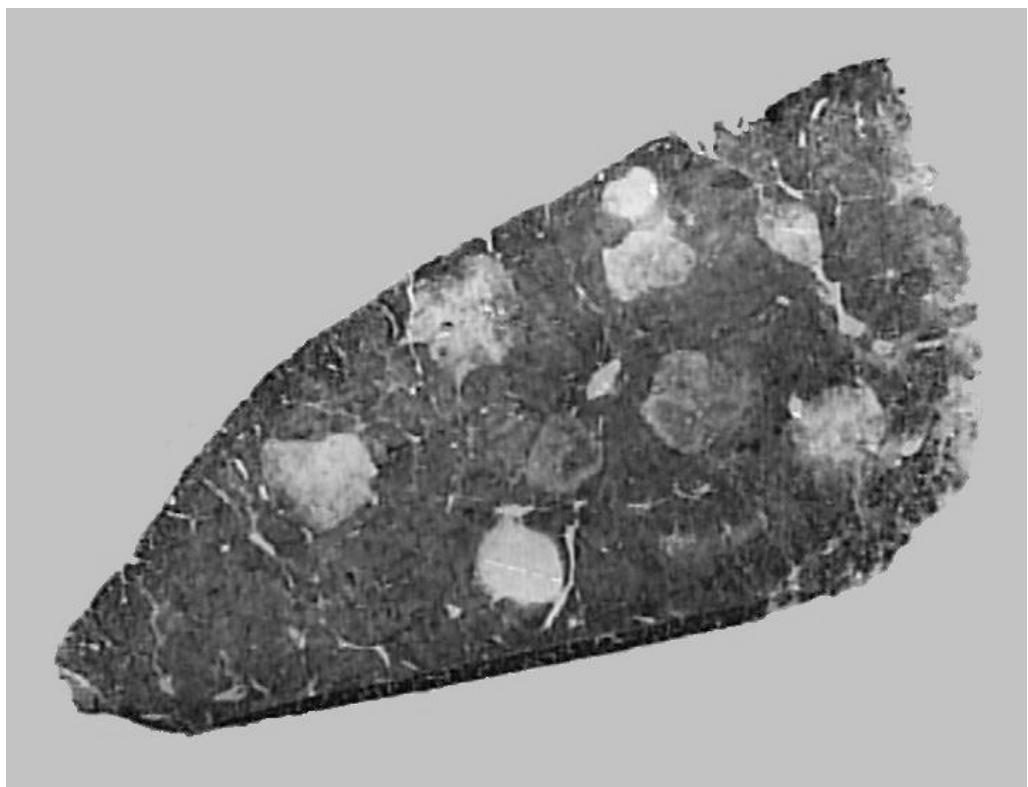


Figura 5 - Fotomicrografia de corte histológico de fígado corado pela reação histoquímica para G6Pase de animal submetido ao modelo HR.

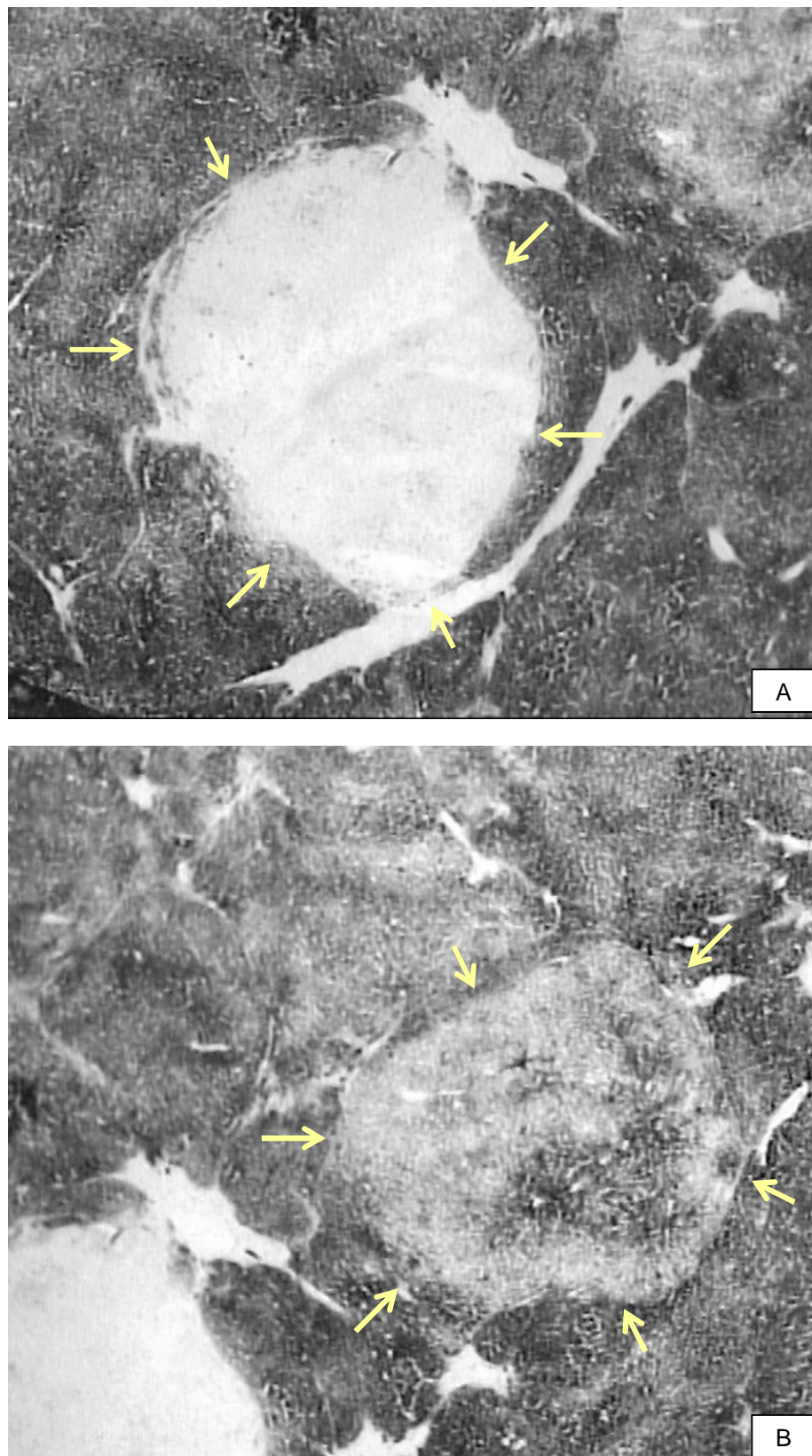


Figura 6 - Fotomicrografias de corte histológico de fígado submetido à reação histoquímica para G6Pase apresentando nódulo persistente (A) e em remodelação (B). As setas apontam a delimitação dos nódulos.

5.2.3 Análise morfométrica

Os dados morfométricos das LPN observadas em cortes histológicos corados pela reação histoquímica para G6Pase de animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese HR são apresentados na Tabela 5.

Os animais do grupo Café apresentaram redução estatisticamente significativa em todos os parâmetros morfométricos analisados. Houve redução de 78% no número total de LPN, 85,5% no número de nódulos persistentes, 70,5% no número de nódulos de remodelação e 86,8% na área ocupada pelas LPN.

Tabela 5 - Morfometria de LPN em cortes histológicos corados para G6Pase de animais submetidos ao modelo HR

Grupo	Nº animais	Nº LPN/cm ²	Nº lesões persistentes /cm ²	Nº lesões de remodelação /cm ²	% Área lesões /área tecido
CO CA	5	41,52 ± 17,14 ^a	20,67 ± 11,95 ^a	20,85 ± 5,51 ^a	11,12 ± 2,59 ^a
Café CA	7	9,14 ± 1,59 ^b	3,00 ± 0,89 ^b	6,15 ± 1,47 ^b	1,47 ± 0,264 ^b

CO CA - grupo que recebeu dieta controle e foi submetido ao modelo HR; Café CA - grupo que recebeu dieta suplementada com café e foi submetido ao modelo HR. Letras sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Mann-Whitney.

5.5 ATIVIDADE DA γ -GLUTAMILTRANSPEPTIDASE

A atividade da GGT analisada em homogeneizado de fígado está representada na Figura 7. A hepatocarcinogênese induzida causou um aumento significativo na atividade da enzima. Entre os animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese HR, os que receberam dieta suplementada com café apresentaram menor atividade da enzima quando comparados aos que receberam dieta controle, embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre estes dois grupos.

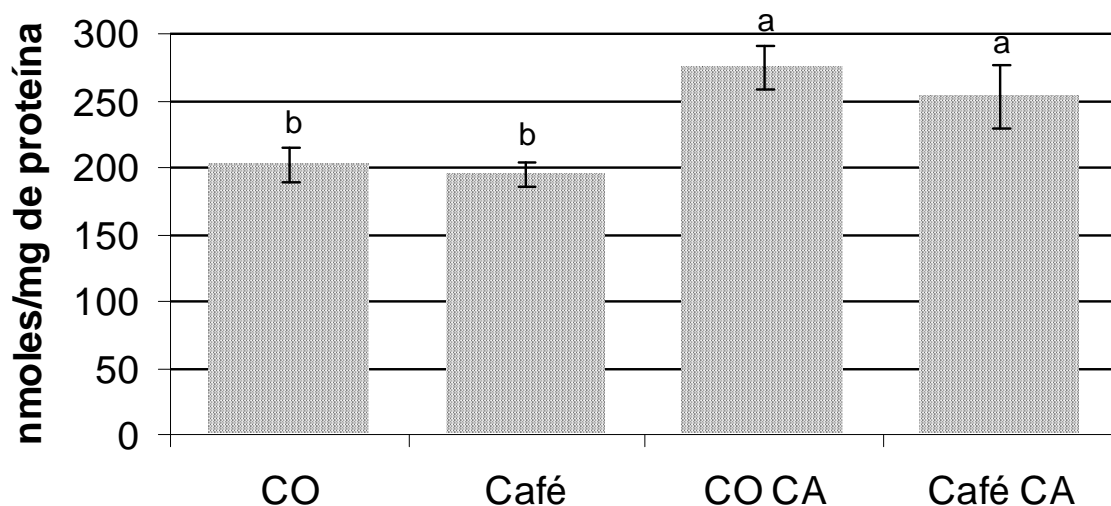


Figura 7 - Atividade da GGT nos diferentes grupos experimentais. CO - grupo que recebeu dieta controle e foi submetido à HP (n=10); Café - grupo que recebeu dieta suplementada com café e foi submetido à HP (n=10); CO CA - grupo que recebeu dieta controle e foi submetido ao modelo HR (n=9); Café CA - grupo que recebeu dieta suplementada com café e foi submetido ao modelo HR (n=8). Letras sobrescritas distintas indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Duncan.

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

No presente estudo foi investigado o efeito da ingestão diária de café sobre a hepatocarcinogênese em ratos utilizando o modelo HR. Este é um modelo de carcinogênese hepática bem caracterizado na literatura e tem sido amplamente utilizado para avaliar os efeitos de compostos potencialmente capazes de modular o processo carcinogênico (MORENO et al., 1995; RIZZI et al., 1997; SHAMAAN et al., 1998). Apresenta como vantagens o aparecimento e crescimento precoce e sincronizado de LPN, permitindo análise seqüencial da carcinogênese, e a diferenciação fácil e precoce das LPN em persistentes e de remodelação por meio de técnicas de histoquímica ou imunohistoquímica, permitindo análise qualitativa e quantitativa (ENOMOTO & FARBER, 1982).

Para avaliar o efeito do café como alimento funcional sobre a carcinogênese hepática, os animais receberam ração suplementada com 1,5% de café liofilizado logo após o desmame (tendo a fêmea matriz recebida a mesma ração durante o período de lactação) e esta foi administrada diariamente ao longo da vida dos animais. De acordo com estudos prévios desenvolvidos pelo nosso grupo, a adição de café a 1,5% à ração não altera a ingestão dos animais (ABREU, 2005; RAMOS, 2007), o que reflete no peso corporal semelhante entre os animais que receberam dieta controle e aqueles que receberam dieta suplementada com café. A decisão de administrar ração suplementada com café durante a lactação foi para garantir que possíveis constituintes ou metabólitos quimioprotetores provenientes do café secretados no leite fossem recebidos pelos filhotes.

Estimando-se um consumo de ração de 30 g/dia, o consumo de café liofilizado pelos animais adultos foi de aproximadamente 0,45 g/dia, o que corresponde a 1,125 g/Kg de peso corporal do animal. Embora a quantidade de café consumida pelos animais seja superior ao consumo humano, o tamanho corporal e o metabolismo mais acelerado dos ratos tornam a quantidade de café ingerida pelos animais comparável ao consumo humano de aproximadamente 800 mL/dia de bebida preparada a 8%.

Neste estudo, o efeito modulador do café foi analisado pela identificação de LPN em cortes histológicos por meio de técnica histoquímica para G6Pase. As LPN,

identificadas como focos de hepatócitos alterados e nódulos hepáticos hiperplásicos com coloração negativa para a enzima G6Pase, resultam da expansão clonal de hepatócitos iniciados e precedem o aparecimento do tumor (DRAGAN & PITOT, 1992).

Estas lesões consistem de focos e nódulos que na sua maioria mostram características de nódulos de remodelação, os quais tendem a regredir e adquirir aspecto semelhante ao do parênquima hepático normal. Poucos nódulos persistem, podendo progredir e originar o carcinoma hepatocelular (ENOMOTO & FARBER, 1982; TATEMATSU et al., 1983).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a ingestão diária de café reduziu significativamente o número de LPN e a área ocupada por estas lesões, indicando que o café exerce efeito modulador sobre a hepatocarcinogênese em ratos submetidos ao modelo HR. Estes achados estão de acordo com os resultados de TANAKA et al. (1990) que verificaram que o café, administrado na água dos animais diariamente por 630 dias, reduziu a incidência de tumor hepático induzido por aminopirina e nitrito de sódio. Assim, embora utilizando métodos diferentes para indução da hepatocarcinogênese e para administração do café, os dois estudos apontam para uma ação quimioprotetora do café sobre a hepatocarcinogênese. Nossos resultados confirmam ainda dados da literatura indicando relação inversa dose-dependente entre o consumo de café e o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, independentemente de sua etiologia (GELATTI et al., 2005) e até mesmo em pacientes portadores do vírus da hepatite tipo C, importante fator de risco para a doença (OHFUJI et al., 2006).

Embora sejam escassos na literatura estudos com o café que demonstrem efetivamente a atividade protetora *in vivo*, alguns mecanismos podem ser sugeridos para o efeito modulador do café.

Na carcinogênese química, além da ação do carcinógeno ou de seu metabólito ativo, dano adicional ao DNA pode ocorrer por radicais livres formados em excesso durante o metabolismo oxidativo do carcinógeno (CHEN & KONG, 2004). Em adição, a indução da proliferação celular e promoção do tumor podem ocorrer por ativação do fator de transcrição proteína ativadora-1, cujo sítio de ligação está localizado na região promotora de vários genes envolvidos na carcinogênese e que é sensível ao estado oxidado intracelular (SEN & PARKER, 1996). A ação de compostos antioxidantes pode ser importante na neutralização de espécies reativas

de oxigênio e no seqüestro de radicais livres, inibindo a peroxidação lipídica na membrana celular e bloqueando a propagação das reações de oxidação na cadeia lipídica. Os compostos antioxidantes poderiam também inibir a proliferação celular e promoção de células pré-neoplásicas pela neutralização de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, inibição da ativação do fator de transcrição proteína ativadora-1.

O extrato de café torrado possui compostos fenólicos que são capazes de aumentar a atividade antioxidante plasmática em humanos (NATELLA et al., 2002). A ação antioxidante é verificada tanto em sistema químico como em biológico, sendo capaz de inibir a formação de radicais peroxil e, conseqüentemente, a peroxidação lipídica (DAGLIA et al., 2000), além de suprimir a mutagenicidade de oxidantes como ter-butil-hidroperóxido (STADLER et al., 1994). Como moduladores do balanço oxidativo do organismo, os compostos antioxidantes do café poderiam inibir o processo oxidativo que está associado à carcinogênese, especialmente nas etapas de iniciação e promoção do processo, os quais são caracterizados por estresse oxidativo.

Além da atividade antioxidante dos constituintes do café, estudos desenvolvidos pelo nosso grupo mostram que o café ativa o sistema de antioxidação endógeno, conduzindo ao aumento hepático dos teores de glutathione, inibindo a peroxidação lipídica e protegendo o fígado de ratos da ação hepatotóxica do paracetamol (ABREU, 2005).

Outro mecanismo que poderia explicar a ação moduladora do café sobre a hepatocarcinogênese se refere à sua ação no sistema de desintoxicação hepático. Muitos carcinógenos químicos, como o 2-AAF e a DEN, necessitam de ativação microsomal antes de reagirem com o DNA e causarem mutações e/ou alterações epigenéticas (VERNA et al., 1996; YAMADA et al., 2006). Dessa forma, a inibição de enzimas envolvidas na ativação de carcinógenos e/ou aumento na atividade de enzimas envolvidas na desintoxicação dos metabólitos tóxicos ativos podem representar importante mecanismo de quimioprevenção da carcinogênese.

HUBER et al. (2003), utilizando café de preparação tipo turca, e ABREU (2005), empregando ração adicionada de extrato de café liofilizado a 1,5%, verificaram aumento na atividade da γ -glutamylcisteína-sintetase, enzima limitante da síntese de glutathione, e de enzimas da FASE II do metabolismo de xenobióticos, como a glutathione S-transferase e UDP-glicuronosil transferases.

A modulação exercida pelo café poderia ainda envolver o reparo de danos no DNA por enzimas específicas. O café de preparação tipo turca é capaz de aumentar a atividade hepática da *O*⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (HUBER et al., 2003). Esta é importante enzima reparadora de danos no DNA e sua redução está fortemente associada a mutagenicidade após exposição a xenobióticos alquilantes (GOODMAN & WATSON, 2002).

Neste estudo foi analisada a atividade da GGT em homogeneizado de fígado. Esta enzima é amplamente utilizada como marcador histoquímico positivo de LPN hepáticas (MORENO et al., 1995; RIZZI et al., 1997; ESPANDIARI et al., 2005). Nossos resultados mostraram que a hepatocarcinogênese aumentou significativamente a atividade hepática da GGT. Embora os animais que receberam dieta suplementada com café tenham apresentado menor atividade desta enzima, a determinação da atividade no homogeneizado do fígado não apontou redução significativa nesse marcador pela ingestão de café.

No entanto, subtraindo-se os valores de atividade da enzima dos grupos sadios (Figura 7) daqueles dos grupos submetidos ao modelo HR, notamos que a diferença passa de 7,66% para 27,27%. Esta análise não pôde ser feita estatisticamente por não dispormos de grupos pareados, no entanto, parece-nos razoável admitir que a diferença, corrigida pelos valores nos tecidos sadios, realmente existe. Sem considerar os valores pré-existentes no tecido sadio, resultado semelhante foi encontrado por SHAMAAN et al. (1998). No estudo, a ingestão de vitamina C e aloe vera diminuíram a incidência e área de LPN no fígado de animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese, no entanto, a determinação da atividade da enzima GGT na fração microssomal não confirmou os achados histológicos.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que a ingestão diária de café exerce ação moduladora sobre a hepatocarcinogênese em ratos Wistar submetidos ao modelo HR. Tal constatação foi verificada pelo menor número e tamanho das LPN nos animais que se alimentaram com dieta suplementada com café, sugerindo ação quimioprotetora deste alimento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Café). Disponível em: <<http://www.abic.com.br>> Acesso em: 30 jun 2005.
- ABREU, R.V. *O sistema de biotransformação hepático, induzido pela desnutrição e pelo paracetamol, é modulado pela ingestão de café*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2005. 64 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *J. Vasc. Br.*, v. 3, p. 145-154, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. *A situação do câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2006.
- BURCHELL, B.; BRIERLEY, C.H.; RANCE, D. Specificity of human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. *Life Sci.*, v. 57, p. 1819-1831, 1995.
- CARVALHO, D.G. Função hepática. In: VIEIRA, E.C.; FIGUEIREDO, E.A.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; GOMES, M.V. *Química fisiológica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed. Atheneu, 1995.
- 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, 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, 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 B₁-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 B₁-induced genotoxicity: Mechanisms in rat and human cells. *Food Chem. Toxicol.*, v. 39, p. 549-556, 2001.

- CHARLTON, M.R. Protein metabolism and liver disease. Baillibre's Clin. *Endocrinol. Metab.*, v. 10, p. 617-635, 1996.
- CHEN, C.; KONG, A.N.T. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 36, p. 1505-1516, 2004.
- CHIQUOINE, A. D. The distribution of glucose-6-phosphatase in the liver and kidney of the mouse. *J. Histochem. Cytochem*, v. 1, p. 429-435, 1953.
- CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.). *Coffee: Chemistry*. 2. ed. New York: Elsevier, 1989. 305p apud ABREU, R.V. *O sistema de biotransformação hepático, induzido pela desnutrição e pelo paracetamol, é modulado pela ingestão de café*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2005. 64 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- 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, p. 91-106, 1991.
- CLOTTE, E.; MIDDLEDITCH, C.; BURCHELL, A. Rat liver glucose-6-phosphatase system: Light scattering and chemical characterization. *Arch. Biochem. Biophys*, v. 408, p. 33-41, 2002.
- CORRAO, G.; ZAMBON, A.; BAGNARDI, V.; D'AMICIS, A.; KLATSKY, A. Coffee, caffeine, and risk of liver cirrhosis. *Ann. Epidemiol.*, v. 11, n. 7, p. 458-465, 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, p. 1700-1704, 2004.
- DE MARIA, C.A.; MOREIRA, R.F.A. Métodos para análise de ácido clorogênico. *Quím. Nova*, v. 27, p. 586-592, 2004.
- DEVASAGAYAM, T.P.A.; KAMAT, J.P.; MOHAN, H.; KESAVAN, P.C. Caffeine as an antioxidant: Inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1282, p. 63-70, 1996.
- 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, p. 739-750, 1992.
- DUNCAN, B.B. Multiple range and multiple F-tests. *Biometrics*, v. 11, p. 1-42, 1955.

- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). *Economia cafeeira*. Disponível em: <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, p. 139-153, 2000.
- ENOMOTO, K.; FARBER, E. Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. *Cancer Res.*, v. 42, p. 2330-2335, 1982.
- ESPANDIARI, P.; ROBERTSON, L.W.; SRINIVASAN, C.; GLAUERT, H.P. Comparison of different initiation protocols in the resistant hepatocyte model. *Toxicology*, v. 206, p. 373-381, 2005.
- FARBER, E.; RUBIN, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. *Cancer Res.*, v. 51, p. 2751-2761, 1991.
- 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, p. 251-260, 2003.
- FILLIBEN, J.J. The probability plot correlation coefficient test for normality. *Technometrics*, v. 17, p. 111-117, 1975.
- 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, p. 5600-5603, 2000.
- GARCEA, R.; DAINO, L.; PASCALE, R.; SIMILE, M.M.; PUDDU, M.; FRASSETTO, S.; COZZOLINO, P.; SEDDAIU, M.A.; GASPA, L.; FEO, F. Inhibition of promotion and persistent nodule growth by *S*-adenosyl-L-methionine in rat liver carcinogenesis: Role of remodeling and apoptosis. *Cancer Res.*, v. 49, p. 1850-1856, 1989.
- 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, p. 528-534, 2005.
- GONZALEZ, F.J. JAISWAL, A.K.; NEBERT, D.W. P450 genes: Evolution, regulation, and relationship to human cancer and pharmacogenetics. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, v. 51, p. 879-880, 1988.

- GONZALEZ, F.J. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: Studies with CYP2E1. *Mutat. Res.*, v. 569, p. 101-110, 2005.
- GOODMAN, J.I.; WATSON, R.E. Altered DNA methylation: A secondary mechanism involved in carcinogenesis. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 42, p. 501-525, 2002.
- 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, p. 547-554, 1997.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de fisiologia médica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 745-749.
- HANES, C.S.; HIRD, F.J.R. Synthesis of peptides in enzymic reactions involving glutathione. *Nature*, v. 166, p.288-292, 1950.
- HANIGAN, M.H. γ -Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: Its expression and function in carcinogenesis. *Chem. Biol. Interact.*, v. 111-112, p. 333-342, 1998.
- HANIGAN, M.H.; FRIERSON-JR, H.F. Immunohistochemical detection of γ -glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 44, p. 1101-1108, 1996.
- HANIGAN, M.H.; PITOT, H.C. γ -Glutamyl transpeptidase – its role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 6, p. 165-172, 1985.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, v. 48, p. 422-427, 1972.
- HEBER, D. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. *J. Postgrad. Med.*, v. 50; 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.*, 113, 420-428, 2007.
- 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^6 -methylguanine-DNA methyltransferase in rat liver – comparison with phase II xenobiotic metabolism. *Mutat. Res.*, v. 522, p. 57-68, 2003.

- 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, 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, p. 209-217, 2002_a.
- 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 c-glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of chemoprotective glutathione synthesis, in several organs of the rat. *Arch. Toxicol.*, v. 75; p. 685-694, 2002_b.
- 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: 07 fev. 2007.
- JANECKE, A.R.; MAYATEPEK, E.; UTERMANN, G. Molecular genetics of type 1 glycogen storage disease. *Mol. Genet. Metab.*, v. 73, 117-125, 2001.
- JESUS, R.P.; WAITZBERG, D.L.; CAMPOS, F.G. Regeneração hepática: Papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Rev. Ass. Med. Brasil.*, v. 46, p. 242-254, 2000.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 268-284.
- KITAGAWA, T.; PITOT, H.C. The regulation of serine dehydratase and glucose-6-phosphatase in hyperplastic nodules of rat liver during diethylnitrosamine and N-2-fluorenylacetamide feeding. *Cancer Res.*, v. 35, p. 1075-1084, 1975.
- KLOVER, P.J.; MOONEY, R.A. Hepatocytes: Critical for glucose homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 36, p. 753-758, 2004.
- LAMBERT, R. *Surgery of the digestive system of the rat*. Springfield: Charles C. Thomas; 1965. p. 53-69.

- LELOUP, V.; LOUVRIER, A.; LIARDON, R. Degradation mechanisms of chlorogenic acids during roasting. *Proceedings of the International Congress of ASIC*, v. 16, 1995, p.192-198.
- LOPES, E.C.F.; DERIVI, S.C.N.; MENDEZ, M.H.M. Importância da dieta na epidemiologia do câncer de colon e reto. *Rev. Saúde Públ.*, v. 18, p.405-410, 1984.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- 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-nitrosodimethyl amine in a human derived liver cell line (HepG2). *Food Chem. Toxicol.*, v. 43, p. 433-441, 2005.
- MANN, H.B.; WHITNEY, D.R. On a test of whether on of two random variables is socastically larger than the other. *Ann. Math. Stat.*, v. 18, p. 50-60, 1947.
- MELO, G.B.; SILVA, R.L.; FAKHOURI, R.; MELO, V.A.; LIMA, S.O. Efeito do omeprazol e do pantoprazol sobre a regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos. *Acta Cir. Bras.*, v. 18, p. 542-544 , 2003.
- MENDILAHARSU, M.; DE STEFANI, E.; DENEOPELLEGRINI, H.; CARZOGLIO, J.C.; RONCO, A. Consumption of tea and coffee and the risk of lung cancer in cigarette-smoking men: A case control study in Uruguay. *Lung Cancer*, v. 19, p. 101-107, 1998.
- MICHELS, K.B.; HOLMBERG, L.; BERGKVIST, L.; WOLK, A. Coffee, tea, and caffeine consumption and breast cancer incidence in a cohort of swedish women. *Ann. Epidemiol.*, v. 12, p. 21-26, 2002.
- MONTEIRO, M.C.; TRUGO, L.C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quim. Nova*, v. 28, 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 β -carotene and vitamin A effects on a hepatocarcinogenesis model. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, v. 65, p. 87-94, 1995.

- 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, 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, p. 57-62, 1999.
- 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, 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, p. 201-208, 2006.
- ONG, T.P. *Quimioprevenção do câncer: dos alimentos à farmácia*. In: Aula ministrada na disciplina Bromatologia - Tópicos Gerais - da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2005 (Apresentação PPT). Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/nutricao_e_cancer.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2007.
- PAOLINELLI, S. T. *Ação da cúrcuma como alimento funcional sobre o sistema de biotransformação de xenobióticos induzido pela desnutrição*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2002. 73 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta*, v. 333, p. 19-39, 2003.
- PATARROYO, M.E. Analysing coffee's chemical composition and its biological effects on human health. In: ILLY, E.; PIZANO, S.D. (Ed.) *New research on coffee and health; proceedings of the International Seminar on Coffee and Health 40th Aniversary meeting of the ICO*. Cartagena: Colombia, 2003. p. 62-74 apud

- MIZUBUTI, Y.G.G. *Efeito do consumo de café sobre o sistema antioxidante e os níveis séricos de lipídeos em camundongos LDLr knockout e C57BL6*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2006. 98 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- PELKONEN, O.; NEBERT, D.W. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.*, v. 34, p. 189-212, 1982.
- PERFECTO, I.; VANDERMEER, J.; MAS, A.; PINTO, L.S. Biodiversity, yield, and shade coffee certification. *Ecol. Econ.*, v. 54, p. 435-446, 2005.
- PITOT, H.C.; DRAGAN, Y.P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *Mech. Carcin. – The FASEP J.*, v. 5, p. 2280-2286, 1991.
- PITOT, H.C.; DRAGAN, Y.P. The multistage nature of chemically induced hepatocarcinogenesis in the rat. *Drug Metab. Rev.*, v. 26, p. 209-220, 1994.
- RAMALHO, F.S. A regeneração hepática e os inibidores da enzima conversora da angiotensina. *Acta Cir. Bras.*, v.15 (suplemento 2), p. 18-23, 2000.
- RAMALHO, F.S.; RAMALHO, L.N.Z.; ZUCOLOTO, S.; CASTRO-SILVA JR., O. Regeneração hepática: Algumas definições num universo de incertezas. *Acta Cir. Bras.*, v. 8, p. 177-189, 1993.
- 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).
- RIZZI, M.B.S.L.; DAGLI, M.L.Z.; JORDÃO JR, A.A.; PENTEADO, M.V.C.; MORENO, F.S. β -carotene inhibits persistent and stimulates remodeling γ GT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, v. 57, p. 415-422, 1997.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; SCHOEN, F. J. Robbins - *Patologia estrutural e funcional*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. *Dig. Liver Dis.*, v. 34, p. 105-110, 2002.
- RODRIGUEZ, T.; ALTIERI, A.; CHATENOU, L.; GALLUS, S.; BOSETTI, C.; NEGRI, E.; FRANCESCHI, S.; LEVI, F.; TALAMINI, R.; LA VECCHIA, C. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol.*, v. 40, p. 207-213, 2004.

- SAHA, B.K.; SARKAR, A.; BASAK, R.; CHATTERJEE, M. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses the effect of streptozotocin-induced diabetes during chemical rat liver carcinogenesis. *Cell Biol. Int.*, v. 25, p. 227-237, 2001.
- SÁNCHEZ-PÉREZ, Y.; CARRASCO-LEGLEU, C.; GARCÍA-CUELLAR, C.; PÉREZ-CARREÓN, J.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, S.; SALCIDO-NEYOY, M.; ALEMÁN-LAZARINI, L.; VILLA-TREVINO, S. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.*, v. 217, p. 25-32, 2005.
- SASAKI, T.; YOSHIDA, T. Experimentelle erzeugung des lebercarcinoms durch fütterung mit o-amidoazotoluol. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol.*, v. 295, p. 175-200, 1935 apud ESPANDIARI, P.; ROBERTSON, L.W.; SRINIVASAN, C.; GLAUERT, H.P. Comparison of different initiation protocols in the resistant hepatocyte model. *Toxicology*, v. 206, p. 373-381, 2005.
- SCHERER, E.; EMMELLOT, P. Kinetics of induction and growth of precancerous liver-cell foci, and liver tumour formation by diethylnitrosamine in the rat. *Europ. J. Cancer*, v. 11, p. 689-696, 1975.
- SEN, C.K.; PARKER, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.*, v. 10, p. 709-720, 1996.
- SHAMAAN, N.A.; KADIR, K.A.; RAHMAT, A.; NGAH; W.Z.W. Vitamin C and aloe vera supplementation protects from chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Nutrition*, v. 14, p. 846-852, 1998.
- SICHERI, R.; EVERHART, J.E.; MENDONÇA, G.A.S. Diet and mortality from common cancers in Brazil: An ecological study. *Cad. Saúde Públ.*, v. 12, p. 53-59, 1996.
- SOLT, D.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, v. 263, p. 701-703, 1976.
- SQUIRE, R.A.; LEVITT, M.H. Report of a workshop on classification of specific hepatocellular lesions in rats. *Cancer Res.*, v. 35, p. 3214-3223, 1975.
- STADLER, R.H.; TURESKY, R.J.; MULLER, O.; MARKOVIE, J.; LEONG-MORGENTHALER, P. The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity. *Mutat. Res.*, v. 308, p. 177-190, 1994.
- SU, Q.; BANNASCH, P. Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, v. 31, p. 126-133, 2003.

- SURH, Y-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Rev. Cancer*, v. 3, p. 768-780, 2003.
- TANAKA, K.; TOKUNAGA, S.; KONO, S.; TOKUDOME, S.; AKAMATSU, T.; MORIYAMA, T.; ZAKOUJI, H. Coffee consumption and decreased serum gamma-glutamyltransferase and aminotransferase activities among male alcohol drinkers. *Int. J. Epidemiol.*, v. 27, p. 438-443, 1998.
- 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.
- TATE, S.S.; MEISTER, A. Interaction of γ -glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides, and derivatives and analogs of glutathione. *J. Biol. Chem.*, v. 249, p. 7593-7602, 1974.
- TATEMATSU, M.; NAGAMINE, Y.; FARBER, W. Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. *Cancer Res.*, v. 43, 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, p. 695-700, 2003.
- TEEBOR, G.W.; BECKER, F.F. Regression and persistence of hyperplastic hepatic nodules induced by *N*-2-Fluorenylacetylamide and their relationship to hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, v. 31, p. 1-3, 1971.
- VERNA, L.; WHYSNER, J.; WILLIAMS, G.M. 2-Acetylaminofluorene mechanistic data and risk assessment: DNA reactivity, enhanced cell proliferation and tumor initiation. *Pharmacol. Ther.*, v. 71, p. 83-105, 1996.
- VITORINO, M.D.; FRANÇA, A.S.; OLIVEIRA, L.S.; BORGES, M.L.A. Metodologia de obtenção de extrato de café visando a dosagem de compostos não voláteis. *Revista Brasileira de Armazenamento*, v. especial Café, n.3, p.17-24, 2001.
- WACHSTEIN, M.; MEISEL, E. On the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 4, p. 592, 1956. (carta ao editor).
- WATTENBERG, L.W. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.*, v. 45, p.1-8, 1985.
- YAMADA, K-I.; YAMAMIYA, I.; UTSUMI, H. In vivo detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 40, p. 2040-2046, 2006.

YANAGIMOTO, K.; OCHI, H.; LEE, K-G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 592-596, 2004.