UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA
CÂMPUS DE BOTUCATU

INFLUÊNCIA DO CONSUMO DO CAFÉ (COM E SEM CAFEÍNA) OU DA CAFEÍNA ISOLADA SOBRE A FIBROSE E A PROMOÇÃO DA HEPATOCARCINOGÊNESE QUÍMICA EM RATOS WISTAR MACHOS.

Kelly Silva Furtado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Botucatu – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA
CÂMPUS DE BOTUCATU

INFLUÊNCIA DO CONSUMO DO CAFÉ (COM E SEM CAFEÍNA) OU DA CAFEÍNA ISOLADA SOBRE A FIBROSE E A PROMOÇÃO DA HEPATOCARCINOGÊNESE QUÍMICA EM RATOS WISTAR MACHOS.

Doutoranda: Kelly Silva Furtado

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Botucatu – SP

2011

Furtado, Kelly Silva.
Influência do consumo do café (com e sem cafeína) ou da cafeína isolada sobre a fibrose e a promoção da hepatocarcinogênese química em ratos Wistar machos / Kelly Silva Furtado. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011
Orientador: Luis Fernando Barbisan
Capes: 40101045

1. Carcinogênese Química – Quimioproteção. 2. Fígado - fibrose - estudos experimentais. 3. café/cafeína - rato.

Palavras-chave: fígado, TAA, CCl_4, café/cafeína, hepatoprotetor, quimioproteção

"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano."

(Isaac Newton)

Dedicatória

Aos meus pais Walter e Sueli, que são os verdadeiros Doutores da vida. Muito obrigada por todo apoio e amor incondicionais. A vocês dedico mais uma conquista, pois antes desta vitória ser minha com certeza ela é de vocês, que são a estrutura de toda minha trajetória.

A vocês minha eterna admiração, orgulho e meus sinceros agradecimentos!

Agradecimentos Especiais

A Deus!

Ao meu mestre e orientador Luis Fernando Barbisan por todos os ensinamentos, compreensão, apoio e atenção que sempre me dedicou durante estes anos de formação;

Aos membros da banca examinadora pelas críticas e colaborações para minha formação e para conclusão deste trabalho;

Aos meus irmãos Keila e Leandro e cunhados Renato e Dani que, de uma forma ou de outra, apoiaram esta trajetória e conquista;

Às minhas sobrinhas Laura, Júlia, Maria Fernanda e Isabella que fazem minha vida mais feliz com um simples sorriso ou olhar;

À minha grande amiga e companheira Ellen por todo apoio, amizade e carinho;

Às Triamesas "Tra" e "Errinha" por nossa amizade eterna;

Aos meus mascotes Dobzhansky, Duda, Spike e Coca.

Agradecimentos

Aos meus avós, tios e primos;

À Jossimara por toda atenção, paciência e ensinamentos de biologia molecular;

Ao grande amigo e companheiro de sorvete e laboratório "Marcolino";

À amiga e meio "mãe botucuda" Flávia por todos os momentos que dividimos dentro e fora do laboratório, meu carinho, respeito e admiração;

Aos meus amigos de desabafos, risadas e laboratório Paulo ("Chu") e Lucas ("Bu");

À grande amiga e conselheira Fabiana Algarte;

Aos amigos e colegas do Departamento de Patologia e Morfologia João Paulo ("neném"), Alexandre, Tony (Blair), Lucas, Glenda, Elaine, Marise, Jossimara, Bruna, Gisele, João, Natália, Vivi, Bianca, Flávia, Danillo, Fernanda ("Low"), Dani ("tia Sônia"), Justulin, Carol Sarobo, Carol, Marcão, Spike, Lívia, Jaqueline, Nelci, Alexandre, Larissinha, Fernanda Carani, Fran, Robson, Raquel, Wellerson e a todos que aqui não citei;

À Luciana, Vânia, PC, Nathanael, Regina e a todos os demais funcionários da Sessão de Pós-Graduação e Departamentos de Patologia e Morfologia;

Ao professor e amigo Sérgio Luis Felisbino que sempre foi um referencial e um ponto de apoio em minha jornada;

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Patologia e Morfologia que não citei, mas que colaboraram direta ou indiretamente em minha trajetória;

À Fapesp pela bolsa (07/54858-5) e pelo auxílio financeiro (08/50985-5) concedidos para execução e conclusão deste trabalho.

Aos animais

"Foste um instrumento de nosso aprendizado?

Foste apenas um objeto de experiência?

Não!!!

Foste para nós vítimas solicitadas pela ciência

para benefício da humanidade, porém, apesar

do teu olhar mudo e de não teres a permissão da

palavra, isso não nos impedirá de dizer-te

sempre".

Muito Obrigado!

(autoria desconhecida)

Índice Geral

Resumo 14
Revisão da Literatura 16
Fígado 16
Fibrose Hepática 16
Carcinogênese Química Experimental 20
Neoplasias Hepáticas 22
Compostos naturais como agentes quimiopreventivos 25
Café/Cafeína 26
Referências 30
Objetivos Gerais 39
Artigo 1 40
Abstract 41
Introduction 42
Material and Methods 43
Results 47
Discussion 49
Acknowledgements 52
References 53
Table 1 59
Table 2 60
Legend of figures ……..….61
Figure 1 ……..…..63
Figure 2 ……...64
Figure 3 ……...65
Figure 4 ……...…66
Figure 5 ……..…..67
Figure 6 ……...…68
Figure 7 ……..…..69
Artigo 2 70
Resumo 71
Introdução 72
Material e Métodos 74

Resultados 79
Discussão 82
Agradecimentos 85
Referências 86
Tabela 1 91
Tabela 2 92
Legenda das figuras 93
Figura 1 95
Figura 2 96
Figura 3 97
Figura 4 98
Figura 5 99
Figura 6 100
Figura 7 101
Figura 8 102
Conclusões Finais 103
Anexos 104
Anexo 1 105
Anexo 2 106
Anexo 3 107
Anexo 4 108
Anexo 5 109
Anexo 6 110
Anexo 7 111
Anexo 8 112
Anexo 9 113

Resumo

O café e a cafeína são dois potenciais agentes preventivos contra o desenvolvimento ou avanço dos processos de fibrose/cirrose e carcinogênese hepática em humanos, entretanto suas ações são controversas e muitas vezes inconclusivas. Devido a isto, o objetivo deste trabalho foi verificar a ação do café ou da cafeína isolada no fígado de ratos Wistar tratados com tioacetamida (TAA) ou tetracloreto de carbono (CCl_4). Para tanto, os dados experimentais foram distribuídos em dois artigos. No primeiro artigo, foram avaliados os efeitos do café convencional, descafeinado e da cafeína isolada na hepatotoxicidade induzida pela TAA em ratos Wistar. Para tanto, 60 os animais foram divididos em 5 grupos experimentais: G1 (controle negativo), G2 (controle positivo tratado com TAA 200 mg/Kg i.p.), G3 (TAA + café convencional), G4 (TAA + café descafeinado) e G5 (TAA + cafeína a 0,1%). Ao final de 8 semanas de tratamento os ratos foram eutanasiados para coleta do sangue (análises séricas) e do fígado (análises histológicas, histoquímicas e moleculares). De maneira geral os animais tratados com café/cafeína (G3-G5) apresentaram níveis da enzima alanina aminotransferase (ALT), área ocupada por colágenos I e III e expressão da proteína TGF-β1 menores que o grupo controle positivo (G2). Adicionalmente, os grupos G3 e G5 apresentaram menor número de núcleos PCNA positivos em fase S do que o grupo G2. O grupo G3 também apresentou menor número de focos GST-P positivos que o grupo G2. Ademais, os grupos G4 e G5 apresentaram as maiores atividades de MMP-2 ativa. Em conclusão, tanto o café convencional como o descafeinado como a cafeína a 0,1% apresentaram efeitos benéficos, mostrando que os outros componentes do café, mesmo sem a cafeína, ou que somente a cafeína são capazes de reduzir a hepatotoxicidade no fígado de ratos Wistar tratados com TAA.

No segundo artigo, foram avaliados os efeitos da ingestão de três preparados de café e duas concentrações de cafeína sobre os processos de fibrose e de hepatocarcinogênese química induzidos no modelo DEN/CCl_4. Para tanto, 90 ratos Wistar machos foram distribuídos em 6 grupos, sendo que todos receberam dose única i.p. de dietilnitrosamina (DEN, 200 mg/kg p.c.) e aplicação semanal i.g. de tetracloreto de carbono (CCl_4, 0,5 mg/kg p.c., até a 10ª semana e 1,0 mg/kg até a 24ª semana.). Uma semana após a iniciação com a DEN, os animais dos grupos G2-G6 receberam cafeína 0,1% (G2), cafeína 0,2% (G3), café convencional (G4), café instantâneo (G5) e café descafeinado (G6) *ad libitum* durante cinco dias por semana. Ao final da 25ª semana, os

animais foram eutanasiados para coleta do sangue (análises séricas) e do fígado para análise histológica (HE), histoquímica (picrossirius e reticulina), imunoistoquímica (GST-P, PCNA, caspase-3 e TGF-β1), PCR em tempo real (colágenos I e III e TGF- β1) e *Western Blotting* (TGF- β1, bax e bcl-2). De maneira geral, os grupos tratados com café/cafeína apresentaram menores níveis de ALT, porcentagem de área ocupada por fibras de colágeno I e III e expressão do RNAm do colágeno I. Os grupos G2 e G5 apresentaram menores áreas ocupadas por lesões GST-P positivas. Não houve diferença na expressão do RNAm e da proteína TGF-β1. Esses dados mostram que o café convencional, o descafeinado e a cafeína são potenciais hepatoprotetores contra o avanço da fibrose. Além disso, o café instantâneo e a cafeína a 0,1% exercem efeito de quimioproteção no fígado de ratos Wistar tratados com DEN/CCl_4.

Palavras-chave: fígado, TAA, CCl_4, café/cafeína, hepatoprotetores, quimioproteção

Revisão da literatura

Fígado

O fígado é composto por dois tipos principais de células, os hepatócitos e as células ductais, bem como as encontradas no espaço de Disse (células de Ito ou estreladas), nos sinusóides (células endoteliais e de Kupffer) e no tecido conjuntivo do espaço porta (fibroblastos, linfócitos e polimorfonucleares) (Kierszenbaum, 2004). Como funções o fígado tem a tarefa de manter a homeostase metabólica corporal, que inclui o processamento dos aminoácidos, carboidratos, lipídios e vitaminas; síntese de proteínas séricas e metabolismo de hormônios e biotransformação de drogas com conseqüente liberação no sangue e na bile de resíduos endógenos e xenobióticos poluentes, sendo, portanto, um alvo freqüente de inúmeras doenças (Robbins and Cotran, 2005).

Experimentalmente, esse órgão se destaca por ser alvo de toxicidade de substâncias químicas que levam ao desenvolvimento de lesões proliferativas e não proliferativas hepatocíticas, colangiocelulares e estromais (Goodman et al., 1994; Hardisty and Brix, 2005) e para o estudo das diferentes etapas da carcinogênese química, devido ao seu grande tamanho, sua relativa homogeneidade estrutural e em particular, pela facilidade de indução e detecção de lesões pré-neoplásicas (Farber and Sarma, 1987; Bannasch and Zerban, 1992; Hasegawa and Ito, 1992).

Por ser o centro metabolizador do organismo, o fígado é alvo de uma variedade de agressões metabólicas, circulatórias, tóxicas, microbianas e neoplásicas (Crawford, 2000). Estas agressões podem levar a respostas hepáticas diferentes, sejam elas reversíveis ou irreversíveis. Dentre as respostas hepáticas reversíveis pode-se citar a esteatose, fibrose, etc , que retirado o estímulo agressor faz com que o fígado retorne a seu estado de normalidade. Dentre as alterações irreversíveis encontram-se, principalmente, a fibrose (em grau mais avançado), cirrose e as neoplasias hepáticas (Guitiérrez-Ruiz and Gómez-Quiroz, 2007).

Fibrose Hepática

A maioria das doenças hepáticas crônicas segue um caminho comum, ou seja, inicia-se com processos inflamatórios, passam pela fibrose e evoluem para cirrose. O processo de hepatotoxicidade crônico, que pode levar ao desenvolvimento de fibrose ou

cirrose hepática, está associado ao alto índice de morbidade e mortalidade (Anselmi et al, 2002).

A fibrose e a cirrose hepáticas representam as conseqüências de um processo regenerativo sustentado em resposta a injúria persistente, de diversas causas, como a infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV, sigla do termo em inglês) ou consumo exagerado de bebidas alcoólicas. O processo fibrótico é resultado de uma agressão hepática e consiste em acúmulo de proteínas da matriz extracelular (MEC), principalmente colágenos (tipos I e III), proteoglicanos e glicoproteínas, gerando modificação da arquiterura hepática e, consequentemente, diminuição da função hepática (Guitiérrez-Ruiz and Gómez-Quiroz, 2007). A fibrose hepática é iniciada por uma cascata de eventos resultantes de danos hepatocíticos, recrutamento de células inflamatórias para o fígado injuriado e ativação de células produtoras de colágeno (Wanless, 2004; Fallowfield et al., 2006). A cirrose é o resultado final do processo de fibrose e expressa a subversão do parênquima com a formação de nódulos e conseqüente comprometimento da função hepática (Friedman, 1993; Severi et al., 2010).

As células responsáveis pela fibrose nas doenças hepáticas crônicas parecem ser miofibroblastos ativados. Esses miofibroblastos tem origem duvidosa, porém existem evidências de que células da medula óssea ou células mesenquimais circulantes possam migrar para o fígado injuriado e tornarem-se miofibroblastos para participar do processo fibrótico (Kisseleva et al., 2006). Porém, também existem evidências limitadas que hepatócitos, colangiócitos e células endoteliais sofram transição para células mesenquimais e se tornem miofibroblastos ativados. Outra hipótese é que células residentes no fígado sejam ativadas e se tornem miofibroblastos. Essas células podem ser fibroblastos teciduais localizados no trato portal ou células hepáticas estreladas (CHE) quiescentes localizadas no espaço de Disse. A maior parte das evidências apóia que as CHE quiescentes são ativadas para miofibroblastos, que produzem a cicatriz fibrosa encontrada nas doenças crônicas do fígado (Geerts, 2001; Brenner, 2009). As CHE quiescentes armazenam gordura e vitamina A, sendo os maiores estoques de retinóides do corpo. Quando elas são ativadas perdem esses retinóides e começam a expressar novos receptores como para o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento e transformação beta (TGF-β), e novas proteínas como a alfa-actina do músculo liso. A proliferação de CHE ativadas e a síntese de proteínas da MEC produzem a cicatriz fibrosa. Além dessas funções, as CHE podem contribuir para

hipertensão portal, degradação da MEC normal (pela produção de MMP-2 e 9), para estresse oxidativo, e são a maior fonte de mitógenos primários para hepatócitos, como fator de crescimento hepatocítico (HGF) (Andrade, 2005; Brenner, 2009).

Na progressão da doença hepática crônica para fibrose todas as células hepáticas sofrem modificações. Os hepatócitos são lesados e entram em apoptose. As células endoteliais sinusoidais começam a perder suas fenestrações, o que é denominado acapilarização dos sinusóides. Os macrófagos residentes no fígado (Células de Kupffer) são ativados e produzem uma série de citocinas e quimiocinas. Linfócitos infiltram-se e contribuem para o processo inflamatório. Finalmente, as CHE quiescentes são ativadas e produzem proteínas da matriz extracelular (MEC) (Brenner, 2009).

Alguns autores relatam que o TGF-β é requerido para o processo de fibrose hepática. O TGF-β é uma potente citocina pró-fibrogênica que exerce múltiplos efeitos no "turnover" da MEC, colabora para os processos de apoptose hepatocelular, proliferação e regeneração, inflamação, imunosupressão e carcinogênese hepáticas (Gressner, 2009). Essa citocina pode induzir o processo fibrótico por diversos mecanismos, incluindo ativação de CHE, estimulando a síntese de diversos componentes da MEC, inibindo a degradação da MEC por estimular a produção dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e aumentando a síntese através do sitio AP-1 de seu próprio gene. Entretanto, pesquisas demonstram que o processo fibrótico é dinâmico e pode ter evolução bidirecional (progessão e regressão), existindo os eventos que geram aumento da quantidade de MEC (fibrogênese) e outros que operam em sentido contrário quando há excesso de MEC (fibrólise). A fibrose hepática já foi considerada um processo irreversível, porém avanços no entendimento do processo celular hepático e da biologia molecular resultaram no acúmulo de evidências clínicas e experimentais de recuperação celular hepática com possíveis remodelações da cicatriz tecidual (Wanless, 2004; Fallowfield et al., 2006; Ismail and Pinzani, 2009). Porém, o conceito de reversibilidade da fibrose não é novo, Popper e Udenfreind (1970) já enfatizavam a importância de processos enzimáticos para a regressão da fibrose (Ismail e Pinzani, 2009). Ademais, o processo de regressão depende dos fatores etiológicos que levaram ao desenvolvimento da fibrose, do estado do paciente, fatores genéticos e ambientais (Bataller et et al., 2003). A regressão da fibrose foi bem documentada em doenças hepáticas crônicas, como hepatite autoimune, obstrução biliar, excesso de ferro, esteatohepatite não-alcoólica e hepatites B e C (Hammel et al., 2001; Muretto et al., 2002; Kral et al., 2004).

Camundongos nocaute com deleções dos genes TGF-β1, SMAD3 e MMP-13 são resistentes a fibrose (Hellerbrand et al., 1999). Em adição, estudos demonstram que a apoptose de CHE poderia ser um mecanismo para prevenir ou reverter a fibrose por remover as células fibrogênicas e permitir a degradação normal da cicatriz fibrótica. Isso tem sido demonstrado com estudos em camundongos nocaute para o gene CEBP-β (gene requerido para prevenção da apoptose e ativação das CHE) e com drogas que induzem a apoptose de CHE ativadas (Schnabl et al., 2008).

Cicatrizes progressivas em resposta a danos persistentes ao fígado podem resultar em cirrose, que é o estágio final da fibrose, e uma das maiores causas de mortalidade no mundo. A cirrose hepática é caracterizada por septos fibrosos que dividem o parênquima em nódulos regenerativos que levam a modificações vasculares e hipertensão portal, que podem levar a complicações como sangramento de varizes, encefalopatia hepática, ascites e síndrome hepatorenal. Em adição, essa condição é associada ao HCC, aumentando a razão da taxa de mortalidade (Anselmi et al., 2002; El-Serag, 2002; Yu and Yuan, 2004).

No mundo, de modo geral, infecções virais pelos vírus da hepatite B e C representam a principal causa de fibrose hepática. Entretanto, o consumo crônico de etanol, desordens metabólicas e autoimunes, infecção por helmintos, esteato-hepatite não-alcoolica, substâncias hepatotóxicas, metais pesados e obstrução biliar também podem levar ao desenvolvimento da fibrose, que pode progredir para cirrose e favorecer a instalação do HCC (Arthur, 2000). Porém, Brenner (2009) relata que nos países desenvolvidos a infecção pelo vírus da hepatite C foi a principal causa de fibrose hepática no século 20, já no século 21 a principal causa é a esteatose hepática não-alcoolica.

Experimentalmente, o tratamento crônico com tetracloreto de carbono (CCl_4) produz fenômenos necroinflamatórios cíclicos no fígado, que evoluem para fibrose, inicialmente focal e posteriormente difusa, resultando em aumento da deposição de elementos do tecido conjuntivo e hipertensão portal, via radicais livres provenientes de seu metabolismo. Portanto, a utilização de um modelo experimental utilizando o CCl_4 como agente fibrinogênico se mostra útil para a avaliação da fibrose hepática e de sua possível modulação (Cremonese et al., 2001). O tratamento com o CCl_4 leva ao desenvolvimento do HCC inicialmente por sua metabolização pelo CYP2E1 dando origem ao radical triclorometil e posterior formação do radical triclorometil peróxido, que ataca a membrana celular, gera a perda da homeostase do cálcio levando a ativação

de enzimas de degradação e citotoxicidade. Posteriormente, ocorrem alterações proliferativas e regenerativas no fígado em resposta a hepatotoxicidade e aumento na taxa de divisão celular e da freqüência de danos genéticos que escapam do sistema de reparo do DNA resultando no aumento da freqüência mutagênica e no câncer (Manibusan et al., 2007).

Outro composto hepatotóxico e potencialmente fibrótico é a tioacetamida (TAA), que quando administrada em dose única de 6,6 mmol/Kg i.p. causa necrose hepática severa (Díez-Fernández et al., 1993). O TAA é bioativado pelo CYP e/ou pelo sistema FAD-monooxigenase em metabólitos sulfino (sulfóxido) e sulfeno (sulfona) que são os responsáveis pelo aumento da injúria hepática (Kang et al, 2008). Os radicais livres gerados pela bioativação da TAA causam peroxidação lipídica, como conseqüência da depleção de glutationa, que é um antioxidante presente principalmente no citoplasma e nas mitocôndrias dos hepatócitos (Díez-Fernández et al., 1993). Experimentos demonstraram que o tratamento de camundongos e ratos com tioacetamida (TAA) induz danos às células hepáticas, fibrose e cirrose associadas ao aumento do estresse oxidativo e ativação de CHE (Li et al., 2002., Kang et al., 2005).

Carcinogênese Química Experimental

A carcinogênese química é um processo em múltiplas etapas bem caracterizadas experimentalmente, incluindo as de iniciação, promoção e progressão (Pitot, 2007). A iniciação consiste na ação de compostos genotóxicos sobre o DNA, provocando danos genéticos ainda compatíveis com a sobrevida da célula, mas passíveis de serem transmitidos às células filhas após um ciclo de divisão celular (Pitot, 2007). A fase de promoção caracteriza-se pela proliferação celular, que ocasiona expansão clonal de células iniciadas (Pitot, 2007). Neste estágio a célula acumula progressivamente mutações, agravando a instabilidade genética que pode culminar com a transformação maligna. Se o estímulo promotor for removido em tempo hábil ou o tecido agredido restabelecer sua integridade, este processo pode ser interrompido ou revertido (Pitot, 2007). Na progressão ocorre o desenvolvimento da massa tumoral maligna e eventualmente metástases. Este estágio final está diretamente ligado à perda da estabilidade genética levando a aneuploidias, amplificações e deleções gênicas, enquanto a iniciação e a promoção não causam alterações genéticas em abundância (Pitot, 2007).

O processo de transformação celular ocorre durante o acúmulo progressivo de mutações e alterações epigenéticas (Feo et al., 2006). No mínimo duas classes de genes atuam em sintonia na célula normal e desempenham função importante no desenvolvimento de neoplasias: os proto-oncogenes/oncogenes e genes supressores tumorais. Alterações nestes genes são eventos essenciais no desenvolvimento das neoplasias hepáticas e podem ser identificadas nas diferentes etapas da carcinogênese (Feo et al., 2006).

O câncer hepático induzido quimicamente em roedores ocorre através do desenvolvimento de alterações seqüenciais caracterizadas inicialmente por focos de hepatócitos alterados fenotipicamente (FHAs), adenomas e, por fim, do hepatocarcinoma celular (HCC). A demonstração de que estas alterações estão seqüencialmente associadas indica que os FHAs representam etapas pré-neoplásicas, podendo ser considerados marcadores histológicos da futura neoplasia hepática (Enzmann and Bannasch, 1987; Farber and Sarma, 1987; Farber, 1988). Os FHAs também são identificados em amostras coletadas de autópsias e biópias de fígado e considerados lesões precursoras de adenomas e HCC humanos (Libbrecht et al., 2005).

As lesões hepáticas pré-neoplásicas (LPN), que compreendem os FHAs, são caracterizadas pela ausência de compressão do tecido hepático normal subjacente. Sob coloração de rotina, HE, as LPN podem ser classificadas de acordo com o aspecto citoplasmático em claras, eosinofílicas, basofílicas, tigróides, anfofílicas ou mistas. As lesões de células claras são compostas por hepatócitos de coloração pálida, devido a maior estocagem de glicogênio do que dos hepatócitos normais adjacentes; - as de células eosinofílicas são compostas de hepatócitos com citoplasma mais acidófilo que dos hepatócitos normais adjacentes, devido ao aumento de retículo endoplasmático liso, podendo apresentar pequeno número de células claras. Tanto as células claras como as eosinofílicas são referidas como focos de estoque de glicogênio; - as basofílicas são compostas de uma população de células pouco homogêneas, que contém excesso de ribossomos livres e são pobres em glicogênio; as tigróides consistem de células que apresentam o mesmo tamanho ou são menores que os hepatócitos normais, os cordões hepáticos são levemente tortuosos e a densidade do foco é aumentada comparada ao parênquima hepático circundante; - as lesões anfofílicas são compostas por células aumentadas com citoplasma difusamente eosinofílico, com regiões basofílicas predominantes, resultando em um aspecto anfofílico (Bannasch and Zerban, 1992; Hasegawa and Ito, 1992).

A demonstração de que as células dos FHAs exibem atividade enzimática diferente das células normais permite detectá-las imuno e histoquimicamente através de marcadores enzimáticos como gama-glutamiltranspeptidase (GGT), adenosiltrifosfatase (ATPase), glicose-6 fosfatase (G-6-Pase) e glutationa S-transferase forma placentária (GST-P) (Pitot, 2007). Esta última foi reconhecida como um dos melhores marcadores de focos pré-neoplásicos no fígado de rato (Dragan et al., 1991). A expressão da GST-P é normalmente baixa em hepatócitos fetais, adultos quiescentes ou em regeneração, placenta, coração e outros órgãos de ratos machos, mas significativamente elevada nos rins e pâncreas (Satoh et al., 1985). LPN e neoplasias hepáticas, induzidas em ratos pela utilização do modelo de Solt and Faber (1976), apresentam conteúdos de GST-P cerca de 20 a 50 vezes e de 10 a 30 vezes maior, respectivamente, quando comparados aos valores de fígados normais (cerca de 34 μg e 9,4 μg/g de tecido) (Satoh et al., 1985). Esse aumento é acompanhado pelo aumento da expressão do RNAm da GST-P em LPN e neoplasias hepáicas. A expressão aumentada da GST-P em neoplasias hepáticas pode ser conseqüência do processo de hipometilação de sítios CpG da região promotora do gene da GST-P, o que contribuiria para o aumento da expressão desse gene (Steinmetz et al., 1998).

O significado biológico da expressão aumentada da GST-P em lesões hepáticas pré-neoplásicas e neoplásicas parece ser importante nas etapas iniciais do processo de hepatocarcinogênese química, assim como na adaptação e crescimento seletivo de células iniciadas em ambiente químico tóxico. A GST-P, em contraste as outras famílias de GST, parece ser mais eficiente na neutralização de cancerígenos hidrossolúveis (fracos eletrófilos), e sua expressão é pouco sensível à inibição por ânions orgânicos ou induzida de forma inespecífica por compostos químicos e cancerígenos (Satoh et al., 1985; Satoh and Hatayama, 2002).

Neoplasias hepáticas

O câncer é uma das mais preocupantes doenças do mundo moderno, isto por ser a segunda maior causa de morte nos países desenvolvidos e a terceira no Brasil, sendo precedido apenas pelas doenças cardiovasculares, e no Brasil, também por óbitos devido a causas externas (Koifman and Koifman, 2003). Desta forma, estima-se que uma em cada três pessoas no mundo desenvolverá algum tipo de neoplasia maligna no decorrer de sua vida, o que ratifica a importância da prevenção (Franks and Teich, 1999). Acredita-se que o câncer provém de um conjunto heterogêneo de doenças que têm como

características comuns a proliferação celular descontrolada e a invasão de tecidos adjacentes, as quais são conseqüência de desvios no controle da homeostasia dos tecidos, que levam ao surgimento de células transformadas, que possuem vantagem proliferativa sobre células normais (Robins and Cotran, 2005). O desenvolvimento de neoplasias ou carcinogênese está associado ao acúmulo de alterações no genoma de uma célula, que ocorrem espontaneamente ou por ação de agentes exógenos. Estes agentes podem ser cancerígenos químicos, energia radiante e vírus oncogênicos (Robins and Cotran, 2005). Segundo estudos epidemiológicos, grande parte das neoplasias humanas está relacionada ao modo de vida, fatores ambientais, compostos naturais, infecções e agentes químicos industriais (Wogan et al., 2004). A exposição constante a esses agentes favorece o surgimento de mutações que podem ocasionar alterações na expressão de genes importantes nos processos de proliferação, diferenciação e morte celular, determinando o fenótipo maligno. Desta forma alguns autores sugerem que a carcinogênese é um processo no qual há acumulo de lesões no DNA e progressiva instabilidade genética (Pitot, 1993; Yamasaki and Mironov, 2000).

As principais neoplasias primárias que acometem o fígado são o HCC, oriundo de hepatócitos e o colangiocarcinoma, oriundo do epitélio de ductos biliares. O HCC é o quinto tipo mais comum de neoplasia maligna no mundo, sendo o tipo mais comum de câncer hepático primário, correspondendo a cerca de 85 a 90% do número de casos de neoplasias hepáticas, e é considerada uma doença com baixo prognóstico e sobrevida dos pacientes (Yu and Yuan, 2004; Marrero, 2005; Willner and Reuben, 2005; Motola-Kuba et al, 2006; El-Serag e Rudolph, 2007). De maneira geral, o HCC apresenta maior incidência nos países asiáticos e na África, chegando a atingir taxas de 98,93 casos/100.000 habitantes por ano na Mongólia (Bosch et al., 2005), sendo essas áreas consideradas de alto-risco. Nas áreas consideradas de baixo-risco, como Estados Unidos e Europa Ocidental, a taxa de incidência é menor que 10 casos/100.000 habitantes por ano (Bosch et al., 2005). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2004 o HCC acometeu cerca de 564 milhões de pessoas no mundo, na sua maioria do sexo masculino (Bosch et a.l, 2004). Estes dados demonstram a importância de estudos de prevenção contra o desenvolvimento do HCC.

Dentre os fatores de risco associados ao desenvolvimento de HCC, os mais comuns são os vírus de hepatite B e C (HBV e HCV, respectivamente), a ingestão crônica de etanol, o uso de tabaco, a ingestão de alimentos contaminados com aflatoxinas e uso de contraceptivos orais (Yu and Yuan, 2004; Marrero, 2005; Bosch et

al., 2005; Motola-Kuba, 2006). Desses, o mais comum é a associação entre o HCV e HBV e o desenvolvimento de câncer hepático (Bosch et al., 2005), o que explica as elevadas taxas de incidência dessa neoplasia na Ásia e África, regiões endêmicas de contaminação pelo HBV (Yu and Yuan, 2004; Bosch et al, 2005; McKillop and Schrum, 2005). Ainda, nesses países, a ingestão de alimentos contaminados com aflatoxinas também exerce forte influência no aparecimento de neoplasias hepáticas (Bosch et al., 2005). A infecção crônica por HCV é a responsável pelo aumento na taxa de incidência de HCC nos países da Europa Ocidental e nos Estados Unidos, em conseqüência de epidemia por HCV que atingiu esses países na década de 70 (Yu and Yuan, 2004; Bosch et al, 2005, McKillop and Schrum, 2005). Nesses países ainda, o consumo crônico de etanol, associado ou não ao uso concomitante de tabaco, é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias hepáticas, dado o hábito freqüente de se ingerir bebidas alcoólicas nesses países (Pöschl and Seitz, 2004; McKillop and Schrum, 2005). No Brasil, a incidência do HCC está principalmente associada a infecção crônica por HBV e HCV, sendo que nos estados do Pará, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo o maior agente etiológico é o HBV, e nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e da região sul do país é mais freqüente a presença de HCV (Gonçalves et al., 1997).

As altas taxas mundiais de mortes relacionadas ao câncer podem ser atribuídas ao diagnóstico tardio e as dificuldades no tratamento dessa doença crônico-degenerativa (Parkin, 2001). Em geral, nos pacientes portadores de neoplasias a manifestação dos sintomas é observada apenas na fase terminal da doença, o que implica em diagnóstico tardio. Nessa etapa do desenvolvimento tumoral, as células transformadas possuem um sistema intrínseco de defesa contra medicamentos (alterações em genes de metabolismo, resistência às drogas, etc.) e mecanismos de escape da vigilância imunológica (perda da expressão de moléculas de MHC, baixa expressão de antígenos tumorais, produção de citocinas inibitórias, etc), impossibilitando o sucesso do tratamento em alguns casos (Dierssen et al., 2006). Além disso, a radioterapia, quimioterapia/braquiterapia e remoção ou ressecção cirúrgica são procedimentos de tratamento do câncer extremamente invasivos que podem resultar em efeitos colaterais amplamente adversos a qualidade de vida do paciente sem, no entanto, serem eficazes em 100% dos casos (Wattemberg, 1997). Todos esses fatores ressaltam a importância da prevenção e estudo do câncer, justificando os financiamentos de pesquisas nessa área.

Compostos naturais como agentes quimiopreventivos

Diversos compostos bioativos presentes em alimentos (CBAs) são capazes de modular distintos processos biológicos relacionados à carcinogênese e prevenção de neoplasias, como a proliferação celular e a apoptose; contudo, seus mecanismos de ação são pouco compreendidos (Mo and Élson, 2004; Aggarwall and Shishodia, 2006). Neste contexto, a investigação desses mecanismos contribui não somente para a elucidação de aspectos fundamentais da carcinogênese e do comportamento biológico das neoplasias malignas, como também pode ter um grande impacto em estratégias de prevenção (Ames et al., 1995; De Flora et al., 2001).

A World Cancer Research Foundation e o American Institute for Cancer Research ressaltaram que a incidência de neoplasias malignas no mundo pode ser reduzida em 30-40%, por meio de modificações alimentares e em determinados estilos de vida. Essas organizações estipularam, ainda, em 2001, que a ingestão diária de no mínimo 400 a 600 g de frutas e hortaliças reduz a incidência de uma variedade de neoplasias malignas em no mínimo 20%, desde que implementada por um período prolongado (Nowell et al., 2004).

Deste modo, a quimioprevenção pode ser uma estratégia promissora para o controle de neoplasias e pode ser definida como a utilização de compostos químicos específicos, naturais ou sintéticos, com a finalidade de prevenir, retardar ou reverter o processo de desenvolvimento de neoplasias (Shukla, 2007).

São necessários dispendiosos estudos para identificar e confirmar a atividade quimioprotetora de um composto químico. Levando-se em consideração que muitas alterações genéticas e epigenéticas têm sido relacionadas à formação e ao crescimento de lesões pré-neoplásicas, estudos na área da quimioprevenção da carcinogênese devem envolver investigações detalhadas de substâncias capazes de modular negativamente os mecanismos intrínsecos envolvidos na evolução da carcinogênese (De Flora et al., 1999; D`Agostini et al., 2005).

A intervenção química sobre o desenvolvimento das neoplasias tem grande impacto sobre a sociedade humana. Agentes quimiopreventivos com comprovada eficácia anti-neoplásica poderiam ser consumidos a fim de se evitar um possível desenvolvimento do câncer. Em adição, também poderiamser administrados oralmente (na forma de cápsulas ou suplementos alimentares) como adjuvantes às terapias tradicionais. Entretanto, inúmeros testes de eficácia e avaliações toxicológicas são

necessários para averiguar os possíveis riscos potenciais do uso crônico combinado desses medicamentos antes que sejam comercializados (Crowel, 2005).

Dentre os compostos potencialmente benéficos na prevenção/tratamento de doenças está a cafeína, uma purina conhecida como 1,3,7 trimetilxantina de fórmula molecular C8H10N4O2 e que é um dos principais componentes do café. Acredita-se que sua descoberta tenha ocorrido em torno de 700 a.C. na Etiópia (antiga Abissínia), o que contraria a versão de alguns antropologistas que consideram que o primeiro uso da cafeína, incluída nas plantas, remonta a 600 a.C. (Idade da Pedra). A bebida mais antiga que contém caféina é o chá, porém esse composto também está presente em diversos outros produtos como café, chocolate, refrigerantes a base de cola, etc, e é consumido por bilhões de pessoas no mundo, chegando a ser até vital para a economia de alguns países (Arnaud, 1987; Whitney and Rolfes, 2008).

Café/cafeína

O Brasil é o maior produtor de café do mundo e segundo maior consumidor de bebidas contendo cafeína, perde apenas para os EUA. O consumo moderado de café (3 a 4 xícaras por dia) exerce efeito preventivo de diversas doenças como mal de Parkinson, a depressão, o diabetes, os cálculos biliares, o câncer de cólon e o consumo de drogas como o álcool (http://pt.wikipedia.org). Além disso, o café apresenta propriedades antioxidantes, combatendo radicais livres, e estudos mostram que previne injúrias hepáticas induzidas por diferentes substâncias químicas (Mursu et al., 2005; Gelatti et al., 2005).

A cafeína é metabolizada no fígado por desmetilação (citocromo p450) e por oxidação na posição 8 e sua principal via metabólica, nos seres humanos, continua com a formação de paraxantina. A cafeína é absorvida rapidamente por via oral, atinge o pico plasmático cerca de uma hora após sua ingestão e tem meia vida plasmática de 3 a 7 horas. Os metabólitos ativos da cafeína são a paraxantina, a teofilina e a teobromina (Stavric, 1998).

Existem inúmeras controvérsias sobre o consumo de cafeína e problemas relacionados à saúde, como alguns efeitos adversos que são relatados quanto ao excesso do consumo dessa droga tais como agitação, ansiedade, irritabilidade, insônia, dor de cabeça, irritação gástrica, aumento da freqüência cardíaca e da pressão arterial (Chou and Bennovitz, 1994; Fernstrom, 2000). Já outros estudos reportam efeitos benéficos

do consumo de café em doenças crônicas como o diabetes tipo 2 e o mal de Parkinson (Ross et al., 2000; Salazar-Martinez et al., 2004).

Estudos experimentais em camundongos e ratos mostram a inibição do desenvolvimento de tumores de pele e pulmão pela cafeína quando administrada simultaneamente com o cancerígeno ou durante a fase de promoção da carcinogênese (Xu et al., 1992; Huang et al., 1997; Chung et al., 1998). Em outros órgãos como estômago, glândulas mamárias e fígado também foi descrita a inibição de crescimento tumoral pela cafeína (Hosaka et al., 1984; Vanderploeg e Welsch, 1991; Nishikawa et al., 1992; Balansky et al., 1994). Porém, concomitante a redução da formação de tumores de glândulas mamárias, a cafeína pode intensificar o processo de carcinogênese induzida no cólon (Hagiwara et al., 1999; Tsuda et al., 1999).

Os efeitos do café/cafeina nos processos de fibrose e de hepatocarcinogênese química são ainda inconclusivos e controversos. Hosaka e colaboradores (1984, 2001) e Balansky e colaboradores (1994) mostraram que a administração da cafeína na água de beber reduz o desenvolvimento de tumores hepáticos induzidos quimicamente em roedores durante a fase de iniciação. Entretanto, Hasegawa e colaboradores (1995) relataram que o café ou cafeína não exercem efeito cancerígeno ou anticancerígeno no fígado de ratos machos da linhagem F344 quando administrados na fase de promoção. Relatos recentes mostram que o café instântaneo reduz a fibrose induzida pelo CCl_4 em ratos machos da linhagem Sprague-Dawley (Ozercan et al., 2006; Shi et al., 2010; Shin et al., 2010). Lee e colaboradores (2007) relataram que o pré-tratamento com cafestol e kaweol leva a inibição da peroxidação lipídica e redução da depleção de GSH hepático em camundongos que receberam CCl_4. Em contrapartida, Poyrazoglu e colaboradores (2008) relatam que o café Turco não filtrado potencializou o efeito hepatotóxico do CCl_4 em ratos da linhagem Sprague-Dawley. Morri e colaboradores (2009) observaram fraco efeito protetor sobre estresse oxidativo no fígado de camundongos que receberam café instantâneo, em relação ao risco de desenvolvimento de câncer. Silva-Oliveira e colaboradores (2010) relataram que o extrato de café incorporado na dieta reduziu de forma significativa o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (LPN) no fígado de ratos Wistar. Vitaglione e colaboradores (2010) sugerem que o ácido clorogênico, principal polifenol presente no café, e não a cafeína, o cafestol e o kaweol, seja o responsável pela modulação da concentração do GSH no soro de ratos Wistar submetidos ao modelo de esteatohepatite e tratados com café descafeinado e polifenóis. O estudo também relata que os ratos que consumiram café descafeinado apresentaram

redução do acúmulo de gordura, de deposição de colágeno no fígado, proteção antioxidante devido a fração de polifenois, redução da atividade da glutationa transferase, redução da inflamação, diminuição da concentração de citocinas pró-inflamatórias e aumento das anti-inflamatórias no fígado.

Estudos epidemiológicos relacionam a menor incidência de doenças crônicas no fígado com a ingestão de café e redução no risco de desenvolver HCC (Kurozawa et al., 2005; Shimazu et al., 2005). Cadden e colaboradores (2007), em estudo de revisão, relataram diversos trabalhos que associam o consumo de café/cafeína a menores níveis de transaminases hepáticas no soro (ALT, AST, GGT) e a inibição do processo de hepatocarcinogênese. Entretanto, existem controvérsias entre os autores se esse efeito é devido à cafeína ou aos outros componentes do café (Tanaka et al., 1998; Corrao et al., 2001; Hosaka et al., 2001; Inoue et al., 2005). Ruhl e Everhart (2005) demonstraram que o consumo de alta concentração de cafeína está associado a diminuição dos níveis de ALT, porém Modi e colaboradores (2010) reportaram impacto do consumo de cafeína no processo fibrótico mas não nos níveis de ALT. Pesquisas também demonstram que o café pode ajudar a prevenir a cirrose alcoólica, porém ainda não se sabe qual substância(as) e qual(is) mecanismo(s) é (são) responsável(is) por essa proteção (Corrao et al, 2001; Higdon e Frei, 2006). Klatsky e Armstrong (1992) mostraram que pessoas que consomem quatro xícaras diárias de café apresentam cinco vezes menos chance de desenvolver cirrose alcoólica do que as pessoas que não tomam café, pois existe uma relação inversa entre o consumo de café e o risco de cirrose provocada pelo álcool. Corrao et al. (2001) sugerem que somente o café, e não outras bebidas que contenham cafeína, deva inibir o início da cirrose hepática. Entretanto, Klatsky et al., (2006) não encontraram associação entre o consumo de café e o desenvolvimento de cirrose não-alcoolica. Porém, Costentin e colaboradores (2010) relataram que a cafeína possivelmente contribui para a redução da progressão da fibrose por diminuir fenômenos necroinflamatórios no fígado.

Estudo realizado *"in vitro"* revelou que possivelmente o papel protetor da cafeína seja devido a inibição da proliferação das células tumorais (HCC) por induzir a parada do ciclo celular independente de apoptose. Ocorre uma desregulação na cascata de sinalização, onde algumas quinases são ativadas e sinalizam a parada do ciclo celular (Okano et al., 2008). Outros estudos demonstram que a cafeína e seus metabólitos ativos são capazes de interromper a sinalização do TGF-β em hepatócitos e bloquear as CHE ativadas. Isso ocorreria pela elevação intracelular de adenosina monofostato

cíclica (AMPc), estimulada pelos componentes da cafeína, que resultaria na degradação do SMAD2 (proteína transdutora de sinal, que transmite o sinal dos ligantes do TGF-beta na célula) e consequente diminuição do fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF), que participa da produção de MEC, migração, adesão e diferenciação celulares e estão envolvidos em afecções geradas pelo excesso de deposição de MEC, como nos processos de fibrose e carcinogênese (Bissell et al., 2001; Elliott and Blobe, 2005; Friedman, 2008; Gresner, 2009). Entretanto, Shin e colaboradores (2010) relatam que os outros componentes do café, e não somente a cafeína, tem a propriedade de inativar as CHE via citocinas como TGF-β e PDGF-β.

Devido a estas controvérsias, faz-se necessária a realização de mais estudos para se averiguar a ação do café, com e sem cafeína, na prevenção e tratamento de danos hepáticos, como a fibrose, e no desenvolvimento do processo de hepatocarcinogênese.

Referências

Aggarwall BB. Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. Biochemical Pharmacology. 2006;71:1397-1421.

Ames BN. Gold LS. Willett WC. The causes and prevention of cancer. Proc. Natl. Acad. Sic. 1995; 92:5258-65.

Andrade ZA. Regressão da fibrose hepática. Rev S Brasil Med Trop. 2005; 38(6):514-20.

Anselmi K. Subbotin VM. Nemoto E. Gandhi CR. Accelerated reversal of carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats by the endothelin receptor antagonist TAK-044. J Gastroenterol Hepatol. 2002; 17:589-97.

Arnaud M.J. The pharmacology of caffeine. Prog. Drug Res. 1987;.31:263-313.

Arthur MJP. Fibrogenesis: metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. Am J Physiol Gastrointest Liver Phisiol. 2000;279:245-9.

Balansky RM. Blagoeva PM. Mircheva ZI. Flora SD. Modulation of diethylnitrosamine carcinogenesis in rat liver and oesophagus. Journal of Cellular Biochem. 1994: 56: 449-454.

Bannasch P, Zerban H. Predictive value of hepatic preneoplastic lesions as indicators of carcinogenic response. In: Vainio H, Magee PN, McGregor DB, McMichal AJ, editors. Mechanism of Carcinogenesis in Risk Indetification. Lyon: IARC Sci Publ. 1992; 116: 389- 427.

Bataller R. North KE. Brenner DA., Genetic polymorphisms and the progression of the liver fibrosis. A critical appraisal. Hepatology. 2003; 37: 493-503.

Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. Hepatology. 2001;34:859-867.

Bosch FX. Ribes J. Díaz M. Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. Gastroenterol. 2004; 127:5-16.

Bosch FX, Ribes J, Cléries R, Díaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. Clin Liver Dis. 2005;9:191-211.

Brenner DA. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. Transactions of the American Clinical and Climatological Association. 2009;120:361-7.

Cadden, I.S.; Partovi, N.; Yoshida, E.M. Review article: possible beneficial effects of coffee on liver disease and function.Aliment Pharmacol. Ther. 2007; 26 (1):1-8.

Chou J.M., Bennovitz N.L., Caffeine and Coffee: effects on health and cardiovascular disease. Comp. Biochem. Physiol. 1994;109c:173-89.

Chung FL. Wang M. Rivenson A. Iatropoulos MJ. Reinhard JC. Pittman B. et al. Inhibition of lung carcinogenesis by black tea in Fischer rats treate with a tobacco specific carcinogen: caffeine as an important constituent. Cancer Res. 1998; 58: 4096-101.

Corrao G. Zambon A. Bagnardi V. D'Amicis A. Klatsky A. Coffee, Caffeine, and the Risk of Liver Cirrhosis. AEP 2001; 11(7): 458-465.

Costentin, C.E., Roudot-Thoraval, F., Zafrani, E-S., Medkour, F., Pawlotsky, J-M., Mallat, A., Hézode, C., Association Of Caffeine Intake and Histological Features of Chronic Hepatitis C, Journal of Hepatology (2010), *in press*.

Crawford JM. O fígado e o trato biliar. In: Cotran RS. Kumar V. Collins T. Robbins – Patologia Estrutural e funcional. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000: 759-808.

Cremonese RV. Pereira-Filho AA. Magalhães R. Mattos AA. Marroni CA. Zettler CG. et al. Cirrose experimental induzida pela inalação de tetracloreto de carbono: adaptação da técnica e avaliação da peroxidação lipídica. Arq. Gastroenterol. 2001; 38(1): 40-47.

Crowel JA. The chemopreventive agent development research program in the Division of Cancer Prevention of the US National Cancer Institute: An overview. European Journal of Cancer. 2005; 41:1889–1910.

D'Agostini F. Izzotti A. Balansky RM. Bennicelli C. De Flora S. Modulation of apoptosis by cancer chemopreventive agents. Mutat Res. 2005; 11:591(1-2):173-86.

De Flora S. Bennicelli C. Bagnasco M. Rationale and mechanisms of cancer chemoprevention. Recent Results Cancer Res. 1999;151:29-44.

De Flora S. et al. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. Mutation Research. 2001: 480-481:9-22.

Díez-Fernádez C. Boscá L., Fernández-Simón L., Alvarez A., Cascales M., Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. Hepatology, 1993; 18(4): 912-8.

Dragan YP, Rizui T, Xu Y-H. Na initation-promotion assay in rat live as a potencial complement to the 2-year carcinogenesis bioassay. Fund Appl Toxicol. 1991;16:525-47.

Dierssen JW. De Miranda NF. Mulder A. Van Puijenbroek M. Verduyn W. Claas FH et al. High-resolution analysis of HLA class I alterations in colorectal cancer. BMC Cancer. 2006; 6:233.

Elliott RL, Blobe GC. Role of transforming growth factor beta in human cancer. J Clin Oncol 2005;23:2078-2093.

El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. Hepatology, 2002; 36: S74-83.

El-Serag HB. Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. Gastroenterol. 2007;132:2557-76.

Enzmann H, Bannasch P. Potential significance of phenotypic heterogeneity of focal lesions at different stages in hepatocarcinogenesis. Carcinogenesis. 1987;8:1607-12.

Fallowfield JA. Kendall TJ. Iredale JP., Reversal of fibrosis: No longer a pipe dream? Clin Liver Dis. 2006; 10:481-97.

Farber E, Sarma RSD. Biology of disease. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. Lab Invest. 1987;56:4-22.

Farber E. Cancer development and its natural history. A cancer prevention perspective. Cancer. 1988;62:1676-9.

Feo F, De Miglio MR, Simile MM, Muroni MR, Calvisi DF, Frau M, Pascale RM. Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. Biochimica et Biophysyca Acta, 2006; 1765: 126-47.

Fernstrom, J.D. Can nutrient supplements modify brain function? Am. J. Clin Nutrt., 71: 1669-1673, 2000.

Franks LM, Teich NM. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. Oxford University Press. 1999; 3 ed. p.426.

Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis: Mechanisms and treatment strategies. N Engl J Med 1993;328:1828-35.

Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. Gastroenterology. 2008;134:1655-1669.

Geerts, A. History, heterogeneity, developmental biology and functions of quiescent hepatic stellate cells. Semin. Liver Dis. 2001; 31 (3): 311-35.

Gelatti, U. ; Covolo, L. ; Franceschini, M. ; Pirali, F. ; Tagger, A. ; Ribero, M.L. ; Trevisi, P. ; Martelli, C. ; Nardi, G. ; Donato, F. ; Brescia, H.C.C. Coffee

consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma independently of its aetiology: a case-control study. J. Hepatol. 2005; 45: 528-34.

Goodman DG, Maronpot RR, Newberne PM, Popp NA, Squire RA. Proliferative and selected other lesions of the liver in rats GI-5. In: Guides for Toxicology Pathology. Washington: STP/ARP/AFIP; 1994. p.1-24.

Gonçalves CS, Pereira FE, Gayotto LC. Hepatocellular carcinoma in Brazil: report of a nacional survey (Florianópolis, SC, 1995). Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1997;39:165-70.

Gressner OA. Less Smad2 Is Good for You! A Scientific Update on Coffee's Liver Benefits. Hepatology. 2009; 50 (3): 970-9.

Guitiérrez-Ruiz, MC. Gómez-Quiroz LE. Liver fibrosis: searching for cell model answers. Liver International. 2007: 1478-3223.

Hagigawa A. Boonyaphiphat P. Tanaka H. Kawabe M. Tamano S. Kaneko H. et al. Organ dependent modifying effects of caffeine and two naturally occurring anti-oxidants α-tocopherol and N-tritriacontane –16,-18 dione, on 2-amino 1-methyl 6-phenylmidazol [4-5-b] pyridine (PhIP)-induced mammary and colonic carcinogenesis in female F344 rats. Jpn. J. Cancer Res. 1999; 90: 399-405.

Hammel P. Couvelard A. O`Toole D. Ratouis A. Sauvanet A. Flejou JF. et al., Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the commom bile duct. N Engl J Med. 2001; 344: 418-23.

Hasegawa R, Ito N. Liver cancer-term bioassay in rats for screening of carcinogens and modifying factors in hepatocarcinogenesis. Food Chem Toxicol. 1992;30:979-92.

Hasegawa R. Ogiso T. Imaida K. Shirai T. Ito N. Analysis of the potential carcinogenicity of coffee and its related compounds in a médium-term liver bioassay of rats. Fd Chem Toxic. 1995;33:15-20.

Hardisty JF, Brix AE. Comparative Hepatic Toxicity: Prechronic/Chronic Liver Toxicity in Rodents. Toxicol Pathol. 2005;33:35-40.

Hasegawa R, Ito N. Liver cancer-term bioassay in rats for screening of carcinogens and modifying factors in hepatocarcinogenesis. Food Chem Toxicol. 1992;30:979-92.

Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA. The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. J Hepatol. 1999;30:77-87.

Higdon J.V. Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. Crit Rev Food Sci Nutr. 2006; 46(2):101-23.

Hosaka S. Nagayama H. Hirono I. Supressive effect of caffeine on the development of hepatic tumors induced by 2-acetylaminofluorene in ACI rats. Japanese Journal of Cancer Res. 1984; 75:1058-61.

Hosaka S. Kawa S. Aoki Y. Tanaka E. Yoshizawa K. Karasawa Y. et al. Hepatocarcinogenesis inhibition by caffeine in ACI rats treated with 2-acetylaminofluorene. Food and Chem. Toxicol. 2001; 39: 557-561.

Huang M-T. Xie J-G. Wang ZY. Ho C-T. Lou Y-R. Wang C-X. et al. effects of tea, decaffeinated tea, and caffeine on UVB light-induced complete carcinogenesis in SKH-1 mice: demonstration of tea. Cancer Res. 1997; 57: 2623-2629.

Inoue M., Yoshimi I., Sobue T., et al. Influence of coffee drinking on subsequent risk of hepatocellular carcinoma : a prospective study in Japan. J Natl Cancer Inst. 2005; 97: 293-300.

Ismail MH. Pinzani M., Reversal of liver fibrosis. The Sausi J of Gastroenterology. 2009; 15 (1): 72-9.

Kang JS., Morimura K., Salim EI., Wanibuchi H., Yamaguchi S, Fukushima, S. Persistence of liver cirrhosis in association with proliferation of nonparenchymal cells and altered location of alpha-smooth muscle actin-positive cells. Toxicol Pathol. 2005; 33(3): 329-35.

Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Wongpoomchai R, Chusiri Y, Gonzalez FJ, Fukushima S. Role of CYP2E1 in thioacetamide-induced mouse hepatotoxicity Toxicology and Applied Pharmacology 228 (2008) 295–300.

Kierszenbaum AL. Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia. Rio de Janeiro: Elservier; 2004.

Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamente O, Segovia JC, Schwabe RF, Brenner DA. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. J Hepatol 2006;45:4290–38.

Klatsky AL. Armstrong MA. Alcohol, smoking, coffee, and cirrhosis. Am J Epidemiol. 1992; 136 (10):1248-1257.

Klatsky AL., Morton C., Udaltsova N., et al. Coffee, cirrhosis, and transaminase enzymes. Arch Intern Med. 2006; 166: 1190-5

Koifman S, Koifman RJ. Environment and cancer in Brazil: na overview from a public health perspective. Mutat Res. 2003; 544:305-11.

Kral JG. Thung SN. Biron S. Hould FS. Lebel S. Marceau S. et al., Effects of surgical treatment of the metabolic syndrome on liver fibrosis and cirrhosis. Surgery. 2004; 135:48-58.

Kurozawa Y, Ogimoto I, Shibata A, Nose T, Yoshimura T, Suzuki H, et al. Coffee and risk of death from hepatocellular carcinoma in a large cohort study in Japan. Br J Cancer 2005;93:607-610.

Lee KJ, Choi JH, Jeong HG. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. Food Chem Toxicol 2007;45:2118-2125.

Li X. Benjamin IS. Alexander B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. J. Hepatol. 2002; 36: 488–93.

Libbrecht L, Desmet V, Roskams T. Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. Liver Int. 2005:25:16-27.

Manibusan MK. Odin M. Eastmond DA. Postulated Carbon Tetrachloride Mode of Action: A Review. Journal of Environmental Science and Health Part C. 2007; 25:185–209.

Marrero JA, Hepatocellular carcinoma. Curr Opin Gastroenterol. 2005. 21: 308-12.

McKillop IH, Schrum LW. Alcohol and liver cancer. Alcohol, 2005; 35: 195-203.

Mo H., Elson C.E. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemo-prevention. Exp. Biol. Med. (Maywood). 2004; 229:567–85.

Modi AA. Feld JJ. Park Y. Kleiner DE. Everhart JE. Liang TJ. Hoofnagle JH. Increased Caffeine Consumption Is Associated with Reduced Hepatic Fibrosis. Hepatology. 2010; 51:201-9.

Morii H. Kuboyama A Nakashima T. Kawai K. Kasai H. Tamae K. et al. Effects of Instant Coffee Consumption on Oxidative DNA Damage, DNA Repair, and Redox System in Mouse Liver. J Food Sci. 2009; 74: H155-61.

Motola-Kuba D, Zamora-Valdés D, Uribe M, Mendes-Sánchez N. Hepatocellular carcinoma. An overview. Ann Hepatol. 2006;5:16-24.

Muretto P. Angelucci E. Lucarelli G. Reversibility of cirrhosis in patients cured of thalassemia by bone marrow transplantation. Ann Intern Med. 2002; 136:667-72.

Mursu J. Voutilainen S. Nurmi T. Alfthan G. Virtanen JK. Rissanen TH. et al. The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine concentrations: a clinical trial. Free Radic Biol Med. 2005;38:527-34.

Nishikawa A. Furukawa F. Imazawa T. Yoshimura H. Mitsumori K. takahashi M. Effects of caffeine, nicotine, ethanol and sodium selenite on pancreatic carcinogenesis in hamters after initiation with N-nitrosobis (2.-oxopropyl) amine. Carcinogenesis. 1992; 13:1379-82.

Nowell SA. Ahn J. Ambrosone CB. Gene-nutrient interactions in cancer etiology. Nutrition Reviews. 2004; 62: 427-38.

Okano J, Nagahara T, Matsumoto K, Murawaki Y. Caffeine inhibits the proliferation of liver cancer cells and actives the MEK/ERK/EGFR , Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008; 102(6): 543-51.

Ozercan IH. Dagli AF. Ustundag B. Ozercan MR. Bahcecioglu IH. Çelik H. et al. Does instant coffee prevent acute liver injury induced by carbon tetrachoride (CCl4)? Hepatol Res. 2006;35:163-8.

Parkin DM. Global cancer statistics in the year. Lancet Oncol. 2001; 2:533-43.

Pitot HC. Multistage carcinogenesis--genetic and epigenetic mechanisms in relation to cancer prevention. Cancer detect prev. 1993;17: 567-573.

Pitot, H.C.. Adventures in hepatocarcinogenesis. Annu Rev. Pathol. 2007;2:1-29.

Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. Alcohol and Alcoholism, 2004; 39: 155-165.

Poyrazoglu OK. Bahcecioglu IH Ataseven H. Metin K. Dagli AF. Yalniz MY. Ustundag B. Effect of Unfiltered Coffee on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Rats. Inflammation. 2008; 31 (6): 408-13.

Robbins SL, Cotran RS. Bases patológicas das doenças.7nd ed. Rio de Janeiro: Elservier; 2005.

Ross GW., Abbott RD., Petrovitch H., et al. Association of coffee and caffeine intake with risk of parkinsons disease. JAMA. 2000; 283: 2674-9.

Ruhl CE and Everhart JE, Coffee and tea consumption are associated with a lower incidence of chronic liver disease in the United States. Gastroenterology. 2005; 129:1928–36.

Salazar-Martinez E., Willet WC., Ascherio A., et al. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. Ann Intern Med. 2004; 140:1-8.

Satoh K, Kitahara A, Soma Y, Inaba Y, Hatayama I, Sato K. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase; a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. Proc Natl Acad Sci. 1985;82:3964-8.

Satoh K, Hatayama I. Anomalous elevation of glutathione S-transferase P-form (GST-P) in the elementary process of epigenetic initiation of chemical hepatocarcinogenesis in rats. Carcinogenesis. 2002; 23: 1193-98.

Schnabl B, Scholten D, Brenner DA. What is the potential role of antifibrotic agents for the treatment of liver disease? Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2008; 5:496-7.

Severi T. Van-Malenstein H. Verlype C. Van-Pelt JF. Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets. Acta Pharmacol Sin. 2010 ;31(11):1409-20.

Shimazu T., Tsubono Y., Ohmori K., Koizumi Y., Nishino Y., Shibuya D., Tsuji I . Coffee consumption and the risk of primary liver cancer: pooled analysis of two prospective studies in japan. Int J Cancer, 2005; 116(1): 150-4.

Shi H, Dong L, Zhang Y, Bai Y, Zhao J, Zhang L. Protective effect of a coffee preparation (Nescafe pure) against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. Clin Nutr. 2010; 29(3):399-405.

Shin JW. Wang JH. Kangb JK. Sona CG. Experimental evidence for the protective effects of coffee against liver fibrosis in SD rats. J Sci Food Agric. 2010; 90: 450–5.

Shukla Y. Tea and cancer chemoprevention: a comprehensive review. Asian Pac J Cancer Prev. 2007; 8(2):155-66.

Silva-Oliveira, Eliane M. , Fernandes, Paula A. andMoraes-Santos, Tasso. 'Effect of Coffee on Chemical Hepatocarcinogenesis in Rats', Nutrition and Cancer. 2010; 62 (3): 336 – 42.

Solt D, Faber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. Nature. 1976;263:701-3.

Stavric B. Klassen R. Watkinson B. Karpinski K. Stapley R. Fried P. Variability in caffeine consumption from coffee and tea: Possible significance for epidemiological studies. Foundations of Chemical Toxicology 1998; 26(2): 111-118.

Steinmetz KL, Pogribny IP, James SJ, Pitot HC. Hypomethylation of the rat glutathione S-transferase pi (GSTP) promoter region isolated from methyl-deficient livers and GSTP-positive liver neoplasms. Carcinogenesis. 1998;19:1487-94.

Tanaka K., Tokunaga S., kono S., et al. Coffee consumption and decresead serum gamma-glutamyltransferase and aminotransferase activities among male alcohol drinkers. Int J Epidemiol. 1998; 27: 438-43.

Tsuda H. Sekinek K. Uehara N. Takasuka N. Moore MA. Konno Y. et al. Heterocyclic amine mixtures carcinogenesis and its enhancement by caffeine in F344 rats. Cancer Lett. 1999; 143: 229-234.

Vanderploeg LC. Welsch W. Inhibition by caffeine of ovarian hormone-induced mammary gland tumorigenesis in female GR mice. Cancer Letters. 1991; 56: 245-250.

Vitaglione P. Morisco F. Mazzone G. Amoruso DC. Ribecco MT. Romano A. Coffee Reduces Liver Damage in a Rat Model of Steatohepatitis: The Underlying Mechanisms and the Role of Polyphenols and Melanoidins. Hepatology. 2010; 52 (5):1653-61.

Wanless IR., Pathogenesis of cirrhosis. J Gastroenterol Hepatol. 2004; 19: S369-71.

Wattenberg LW. An overview of chemoprevention: current status and future prospects. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1997; 216: 133-41.

Whitney E, Rolfes SR. Nutrição 1: Entendendo os Nutrientes. 1ed. Cencage, 448p, 2008.

Wikkipédia – A enciclopédia livre [homepage on the internet]. Café. 2010 [acesso 17 de junho de 2010]. Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Caf%C3%A9.

Willner IR, Reuben A. Alcohol and the liver. Curr Opin Gastroenterol. 2005; 21: 323-30.

Wogan GN. Hecht SS. Felton JS. Conney AH. Loebe L.A. Environmental and chemical carcinogênesis. Sem. Cancer Biol.2004; 14: 473-86.

Xu Y. Ho C-T. Amin SG. Han C. Chung F-L. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumor tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major poplyphenol as antioxidants. Cancer Res. 1992; 52: 3875-3879.

Yamasaki H, Mironov N. Genomic instability in multistage carcinogenesis. Toxicol Lett, 2000; 15: 112-113: 251-6.

Yu MC, Yuan J-M. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2004;127: 72-8.

Objetivos Gerais

Analisar os efeitos da ingestão de café (com ou sem cafeína) ou da cafeína isolada, em ratos wistar machos, enfocando:

1 – Atenuação da hepatotoxicidade induzida pela TAA em modelo experimental;

2 – Atenuação do processo de fibrose e hepatocarcinogênese induzidos pelo modelo DEN/CCl_4.

Artigo 1

Modifying effects of coffee or caffeine intake on the liver toxicity induced by thioacetamide in male Wistar rats.

Kelly S. Furtado[1], Monize M. Prado[2], Marco A. Aguiar e Silva[2], Marcos C. Dias[1], Diogo P. Rivelli[3], Luís F. Barbisan[2].

[1] Department of Pathology, College of Medicine, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, 18618-970, São Paulo, Brazil.

[2] Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP São Paulo State University, Botucatu, 18618-970, SP, Brazil.

[3] Departament of Clinical Toxicology, College of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-000 , SP, Brazil,

*Correspondence to:

Luís Fernando Barbisan, PhD. (barbisan@ibb.unesp.br)

Department of Morphology, Institute of Biosciences

São Paulo State University - UNESP

18618-900, Botucatu, SP, Brazil

Abstract

Consumption of coffee beverages reduces the incidence of liver disease. However, whether these beneficial effects on human health are due to caffeine or other specific components in the beverage remains controversial. There, the present study aimed to study evaluated the protective effects of coffee beverages or caffeine on liver toxicity induced by repeated administration of the hepatotoxicant thioacetamide (TAA) in male Wistar rats. Animals were randomized into five groups: untreated controls (G1) TAA only (G2, 200 mg/Kg b.w. twice a week for 8 weeks, i.p.), TAA+conventional coffee (G3), TAA+decaffeinated coffee (G4) and TAA+caffeine (G5, 0.1% in the drinking water). At the end of 8 weeks, the animals were euthanized and blood and liver samples were collected. Serum ALT levels were lower in animals that received coffee and caffeine ($p < 0.001$). In addition, liver oxidized glutathione ($p < 0.05$), fibrosis/inflammation score ($p < 0.001$) and TGF-β expression ($p \leq 0.001$) was reduced in these groups when compared to TAA-only rats. Moreover, conventional coffee and caffeine reduced PCNA S-phase index ($p < 0.001$) but only conventional coffee reduced cleaved caspase-3 index ($p < 0.001$) and active metalloproteinase 2 ($p \leq 0.004$) in the liver from TAA-treated animals. In conclusion, consumption of conventional and decaffeinated coffee and caffeine has beneficial effects against TAA-induced liver injury in Wistar rats.

Key words: Coffee, caffeine, hepatotoxicity, thioacetamide

Short- title: Coffee/caffeine consumption and hepatoprotection.

Introduction

Coffee is one of the most frequently consumed beverages worldwide and its moderate intake is considered safe. Consumption of more than 3 cups/day is inversely related to the incidence of liver diseases because coffee has the potential to reduce the risk of non-alcoholic fatty liver disease, fibrosis/cirrhosis and hepatocellular carcinoma development in patients either infected or not by hepatitis B and C viruses[1-5]. This popular beverage is a complex mixture that contains a variety of volatile and non-volatile compounds, including caffeine, chlorogenic acid and the diterpenes cafestol and kahweol. However, controversies exist to whether the beneficial effects on human health are due to caffeine or other components of coffee beverages[3,5-12]. Experimental data suggests that specific compounds in coffee beverages, other than caffeine, have antioxidant properties and are protective against oxidative damage to DNA and tissues, and reduce fibrosis induced by hepatotoxicants in rats and mice[13-16].

Shi et al. (2010) reported a decrease in transforming growth factor beta-1 (TGF-β1), vascular endothelial growth factor (VEGF), Collagen I and III and Bcl-2 mRNA in the liver from carbon tetrachloride (CCl_4-treated male Sprague-Dawley (SD) rats that received instant coffee intragastrically (i.g) (150-300 mg/kg, b.w,)[16]. Shin et al. (2010) reported that both instant coffee (3%) or decaffeinated coffee (100-300 m/kg b.w.) were protective against dimethylnitrosamine (DMN)-induced liver fibrosis in male SD rats[15]. These effects were most likely due to a reduction in lipid peroxidation and protection of endogenous antioxidant defenses. Moreover, cafestol and kahweol (10-100 mg/kb b.w., i.g.) reduced the deleterious effects of CCl_4 in male ICR (o que essa sigla significa?) mice[13]. In contrast to the protective effects of instant coffee, consumption of unfiltered Turkish coffee increased the liver damage induced by CCl_4 in male SD rats[14,17]. However, these studies used different coffee preparations that might account for the heterogeneity in results, leading to often controversial and inconclusive findings.

Persistent liver injury is associated to the development of inflammation, progression of fibrosis, cirrhosis and ultimately cancer[18,19]. Oxidative stress is involved in the process of fibrogenesis and many fibrogenic agents stimulate free radical generation and accumulation[4,20]. Acute liver injury and fibrosis/cirrhosis can be induced experimentally by administering various chemicals, such as carbon tetrachloride (CCl_4), thioacetamide (TAA), ethionine and DMN[21,22]. TAA, in particular, causes severe centrilobular necrosis associated to oxidative stress[22-24]. TAA is bioactivated by

CYP2E1 and/or FAD-monooxygenase into sulfin (sulfoxide) and sulfenic (sulfone) metabolites that cause liver injury[22,25]. Free radicals generated by the bioactivation of TAA cause lipid peroxidation due to depletion of glutathione and others antioxidant defenses within hepatocytes[22,26,27]. Thus, experimental models of toxic liver injury by TAA are useful to evaluate the pharmacological effects of possible hepatoprotectants, including coffee beverages and caffeine.

Various epidemiological and experimental studies report beneficial effects of coffee and/or caffeine for prevention of liver disease. However, these reports are still inconclusive and often controversial. Since coffee is one of the most popular beverages in the world it is important to evaluate possible hepatoprotective effects of this beverage on repeated liver injury that can progress to fibrosis, cirrhosis and HCC. Therefore, the present study evaluated the effects of conventional and decaffeinated coffee or caffeine alone on liver toxicity induced by repeated administration of TAA in male Wistar rats.

Material and Methods

Animals and treatments

Four-week-old male Wistar rats were purchased from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB, UNICAMP Campinas-SP, Brazil) and housed in polypropylene cages (five animals/cage) in a room with controlled temperature (22±2°C), humidity (55±10%) and light cycle (12-h light-dark cycle). They were fed a commercial chow (LABINA, Purina, Paulínia, SP, Brazil) and tap water *ad libitum* during a 2-week acclimatization period. Animals were randomized into five groups: untreated controls (G1), TAA only (G2, 200 mg/kg b.w. twice a week for 8 weeks, i.p.)[20], TAA+conventional coffee (G3), TAA+decaffeinated coffee (G4) and TAA+caffeine (G5, 0.1% in tap water)[28]. Conventional and decaffeinated coffee beverages were brewed fresh every day using the foloowing recipe: 8g of ground coffee beans in 140 mL of hot water[29]. Body weight and food/liquids consumption were measured weekly throughout the experimental period. After 8 weeks of treatment, the animals were euthanized and blood was drawn for analysis of plasma alanine aminotransferase (ALT) levels and the liver was dissected, weighed and samples were collected for histology and molecular biology analyses. All protocols used were

consistent with the Ethical Principles for Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

Caffeine and chlorogenic acid analysis

Quantification of caffeine and chlorogenic acid in the conventional and decaffeinated coffee beverages administered to the animals was performed by isocratic high performing liquid chromatography as previously described[30]. The system consisted of a Constametric Pump, model 3500 (Fremont, CA, USA), a Rheodyne 7161 (Contati, CA, USA), a manual injector equipped with a 20 L loop and a UN Lab Alliance Model 525 detector (San Jose, CA, USA). The signal produced was transmitted to a Data Jet Thermo Separation Products integrator (San Jose, CA, USA). The separation was achieved on a 10 lm Phenomenex C18 column (Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of a 0.2% aqueous metaphosphoric acid solution:acetonitrile (80:20 v/v) with detection at 330 nm for chlorogenic acid and 275 nm for caffeine with a flow rate of 1.0 mL/min[30]. The concentrations of caffeine and chlorogenic acid were calculated from standard curves prepared with purified compunds and are expressed as mg/mL.

Tissue processing, histology and collagen quantification

Immediately before necropsy, blood was drawn to measure serum levels of ALT by spectrometry to monitor hepatotoxicity[31]. At necropsy, liver samples were either fixed in 4% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 24h and paraffin embedded for histology and immunohistochemistry or snap-frozen in liquid nitrogen for gelatin zymography and western blot.

Histopathology

Paraffin embedded samples were sliced into 5-µm sections and stained with hematoxylin–eosin (HE) for histological analysis. Fibrosis (FS) and inflammation (IS) scores were given on a scale of 0–3 according to a previously described classification[32]. A median liver injury score was also calculated as follows: (FS+IS)/2.

Picrosirius red staining of collagen fibers

Paraffin embedded samples were sliced into 5-µm sections and stained with Picrosirius red for morphometric analysis of collagen fibers[33]. Sections were analyzed using a Leica DMLB 80 microscope connected to a Leica DC300FX camera and the

digitalized images were analyzed in the Leica Q-win software Version 3 (Leica, Heidelberg, Germany) for Windows™ [34] .

Immunohistochemistry

Paraffin embedded samples were sliced into 5-µm sections and immunolabeled with antibodies proliferating cell nuclear antigen (PCNA), cleaved caspase-3, MMP-2 and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) expression using a polymer system (NovoLink Max Polymer Detection System, Leica/Novocastra). Briefly, histological sections were put on poly-l-lysine coated slides, cleared and rehydrated with graded alcohol. Antigen retrieval was achieved using Pascal pressure chamber in 0.01M citrate buffer (pH 6.0) at 120ºC for 3 min (MMP-2 and caspase-3 antibodies) or pretreatment with 0.25% trypsin for 15 min (TGF-β1). Slides were the incubated with 3% H_2O_2 in PBS for 15 min, nonfat milk for 60 min, anti-PCNA (Dako Corporation, Carpinterie, CA, USA, clone PC10, 1:200 dilution), anti-MMP-2 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA, clones C-19, 1:200 dilution), anti-TGF-β1 (R&D Systems clone 9016, 1:50 dilution), and anti-cleaved-caspase-3 (Cayman Chemical Co, MI, EUA, 1:200 dilution) antibodies for 16h at 4°C. Slides were then re-blocked for 30 min and incubated with polymer for 30 min. Chromogen color was accomplished with 3,30-diaminobenzidine tetrahydrochroride (DAB, Sigma–Aldrich Co., St. Louis MO, USA) as the substrate to demonstrate the sites of peroxidase binding. The slides were counterstained with Harris's hematoxylin.

Cell proliferation and apoptosis analysis

PCNA S-phase or growth fraction (late G1, S, G2 and M phases) labeling (%) and cleaved caspase-3 labeling indexes (%) for each animal were estimated by counting the number of positive hepatocytes per total number of counted hepatocytes (~2000)[35,36].

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) for GSH and GSSG quantification

Fresh liver tissue (40 mg) was homogenized into 5 volumes of PBS (pH 6.2) with 1 mmol/L of EDTA and then centrifuged at 10.000 x g for 15 min at 4°C. TSupernatants were mixed with an equal volume of 10% metaphosphoric acid, centrifuged at 10.000 x g for 5 min at 4°C and mixed with 4-triethanolamine (50 µl/ml) to increase the pH before the assay. The supernatant was the incubated with

dithiothreitol (DTT) at 4°C for 5 minutes. Samples used for determination of total glutathione were deproteinated with 2.5% perchloric acid, and a 50 µL aliquot was treated with o-ftaldeído (OPA) and injected into an ODS-2 column (150 x 4.6 mm, 3µm). The mobile phase used propionate buffer (0.021 mol/L, pH 6.5) with acetonitrile (95:5 v / v) eluted by the system at a flow rate of 1mL/min. For the determination of oxidized glutathione, samples were blocked with N-ethylmaleimide (NEM) immediately after the extraction and processed as described above. Glutathione concentration was measured by HPLC (LC10 System - Shimadzu®, Japan) coupled detectors for ultraviolet (UV) and fluorescence. The fraction of reduced glutathione (GSH) was obtained by the difference between total glutathione (GSHt) and oxidized glutathione (GSSG)[37].

Gelatin zymography for MMP-2

Frozen liver samples (300 mg) were mechanically homogenized with a Polytron homogenizer in 50 mM Tris buffer pH 7.5 plus 1% triton-X 100 and CaCl2 10 mM for 30s at 4°C. Samples were centrifuged and protein concentration on the supernatant was quantified by the Bradford method. Aliquots containing 30 µg protein were resolved in 8% SDS-PAGE with 0.1% gelatin under non-reducing conditions for 2h at 100 V, 4°C, in a Bio-Rad MiniProtean II system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA, USA). Gels were washed twice with 2.5% Triton X-100 by gentle shaking at room temperature for 1 h. Gels were then incubated overnight (16 h) in 50 mM Tris–HCl (pH 8.4) containing 5 mM $CaCl_2$ at 37°C. After incubation, the gels were stained by Coomassie Brilliant Blue R-250. Areas of proteolysis appeared as clear zones against a blue background. Protein standards (Bio-Rad Laboratories) were co-electrophoresed to determine molecular mass. The integrated optical density (IOD) spectrophotometry was determinated by an Image Master VDS version 3.0 (Pharmacia Biotechnology, Piscataway, NJ, USA). The values of IOD were analyzed statistically and plotted in histograms[36,38].

Western Blot

Aliquotes of liver homogenates containing 75 µg from liver frozen samples were heated at 95ºC for 5 min in sample-loading buffer, resolved by SDS–PAGE under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were

blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) in tris-buffered saline pH 7.5 with Tween (TBST, 10 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) for 1 hour and incubated overnight with anti-TGF-β1 (1:1,000 dilution, R&D Systems, Minneapolis, USA). Goat anti-β-actin antibody (1:1,000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was used as loading control. After incubation with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated (HRP) secondary antibodies, membranes were incubated with corresponding HRP-conjugated antibodies and developed by chemiluminescence (Pierce® ECL Western Blotting Substrate). TGF-β1 and β-actin protein expression were quantified by densitometric analysis of the bands as IOD. TGF-β1 expression was normalized to β-actin values. Data is shown as relative IOD from rats treated with TAA only as mean±SD.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Sigma Stat Software (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Data from body weight, body weight-gain, absolute and relative liver weight, PCNA-labeling and apoptosis indexes and IOD data (MMP-2 and TGF-β) were analyzed by ANOVA or Kruskal–Wallis tests. The incidence of different types of PNL and non- neoplastic lesions was examined using χ^2 test or the Fischer exact test. Data were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

General findings, ALT and liver injury levels

In all TAA-treated groups (G2-G5), there was a reduction (24 to 31%) in body-weight gain and food and liquid intake throughout the experimental period when compared to untreated rats (G1) ($p<0.001$) (data not shown). Caffeine concentrations in conventional and decaffeinated coffee beverages were 1005 µg/mL and 0, respectivelly. chlorogenic acid concentrations were 414 µg/mL e 284 µg/mL in the conventional and decaffeinated coffee beverages, respectivelly. The average daily intake of caffeine and chlorogenic acid was 19 mg and 8 mg/rat/day in the TAA+conventional coffee group (G3), 0 and 5mg/rat/day in the TAA+decaffeinated coffee group (G4) and 17 and 0 mg/rat/day in the TAA+0.1% caffeine group (G5). At the end 8 weeks, TAA-treated rats (G2-G5) had lower body weight, absolute liver weight and serum ALT levels than

untreated rats (G1) ($p<0.001$) (Table 1). Serum ALT levels were lower in rats that received conventional and decaffeinated coffee and 0,1% caffeine (G3-G5) when compared to rats treated with TAA only (G2) ($p<0.001$) (Table 1).

TAA treatment induced liver injury mainly characterized by hepatocytes death, inflammatory infiltration, appearance of epithelial ductal cells, proliferation of stellate cells and collagen deposition. Rats from TAA+conventional coffee and TAA+0.1% caffeine-group (G3 and G5) had lower fibrosis ($p<0.05$) and inflammatory ($p<0.001$ and $p<0.04$, respectively) scores, resulting in lower median liver injury scores ($p<0.001$, Table 2, figure 1). In addition, a clear reduction ($p<0.01$) in the collagen fibers volume fraction (%) was observed in the liver of rats from TAA+conventional coffee, TAA+decaffeinated coffee and TAA+0.1% caffeine groups (G3-G5) when compared to untreated controls (G1) (Figure 1, 2).

PCNA and cleaved caspase-3 labeling indexes

There was an increase in the number of PCNA and cleaved caspase-3 positive hepatocytes in all animals that received TAA (G2 to G5) when compared to untreated controls (G1) (Figure 3, 4). Rats that received TAA+conventional coffee and TAA+0.1% caffeine (G3 and G5) had less PCNA S-phase-positive hepatocytes than rats that received TAA only (G2) ($p<0.001$). In addition, rats treated with TAA+conventional coffee and TAA+0.1% caffeine groups (G3 and G5) had lower cleaved caspase-3 labeling and growth fraction (G1 late, S, G2 and M phases- positive for PCNA), respectively when compared to rats treated with TAA only (G2).

GSH and GSSG analysis

Levels of reduced glutathione (GSH) were reduced in rats treated with TAA only (G2), together with an increase in oxidized glutathione (GSSG) levels when compared to untreated controls ($p<0.03$ and $p<0.04$, respectively, Figure 5). Conventional and decaffeinated coffee and 0.1% caffeine (G3-G5) showed a trend towards an increase in GSH levels after TAA treatment ($p=0.065$).

MMP-2 activity and TGF-β1 expression

Rats treated with TAA only (G2) had an increase in total and active MMP-2 when compared to untreated controls (G1) (Figure 6). When compared to TAA only (G2), rats treated with TAA+conventional coffee (G3) had a reduction in total and

active MMP-2, whereas rats treated with TAA+decaffeinated coffee and TAA+0.1% caffeine (G4 and G5) showed increased MMP-2 activity ($p \leq 0.004$). No active MMP-2 activity was observed in untreated animals and animals treated with TAA+conventional coffee (G3) (Figure 6). MMP-2 positive hepatocytes were detected mainly in the midzonal and periportal areas from TAA-treated rats (G2-G5) (Figure 4).

TGF-β1 expression in TAA-treated rats, as measured by western blot, is shown in Figure 7. Values were expressed as an average of relative IOD normalized to rats treated with TAA only (G2) . Rats treated with TAA+conventional coffe, TAA+ decaffeinated coffee and TAA+0.1% caffeine (G3-G5) had lower TGF-β1 expression when compared to rats that received TAA only (G2) ($p \leq 0.001$). TGF-β1 positive hepatocytes were located mainly in the Disse's space (Figure 4).

Discussion

The present study evaluated the effects of conventional and decaffeinated coffee beverages or caffeine on liver damage induced by repeated TAA administration in male Wistar rats. In this study the animals ingested an amount of caffeine 10-fold higher than an individual who drink 3-4 cups of coffee per day, suggesting that high doses of caffeine do not exert deleterious effects and are rather protective against TAA-induced liver toxicity in Wistar rats.

Shin et al. (2010) reported that coffee, but not only caffeine, has beneficial effects against hepatic fibrosis/cirrhosis in male SD rats[15]. Lee et al. (2007) found a hepatoprotective effect of kahweol and cafestol, diterpenes present in coffee beverages, in male ICR mice treated with CCL_4[13]. Furthermore, Modi et al. (2010) found no correlation between other caffeinated beverages consumption and reduction of hepatic fibrosis, but reported that caffeine, especially from conventional coffee (> 2 cups/day) was associated to less advanced liver fibrosis, particularly in patients with HCV infection, without changes in ALT serum levels[12]. Ruhl and Everhart (2005) showed that coffee and caffeine consumption reduce ALT levels in Americans[39]. Also, Tverdal and Skurtveit (2003) reported an inverse association between coffee consumption and hepatic cirrhosis in the Norwegian population[40]. Freedman et al. (2009) reported that consumption of 3 or more cups of coffee per day reduces the risk of liver disease progression in 53% when compared to non-coffee drinkers[41]. The findings from our

study suggest that the all treatments were hepatoprotective to some extent, but better results were observed in rats treated with conventional coffee and 0.1% caffeine.

Experimental studies indicate that chronic TAA administration induce liver damage, fibrosis and/or cirrhosis associated to an increase in oxidative stress and activation of Kupffer (KC) and hepatic stellate cells (HSCs)[42,43]. Liver fibrosis is characterized by increased deposition of extracellular matrix (ECM) components in the hepatic parenchyma, principally collagens and proteoglycans[44]. This ECM deposition initially occurs due to loss of hepatocytes by necrosis or apoptosis, inflammation and progressive decline of hepatic function. These hepatic alteration stimulate viable hepatocytes to re-enter the cell cycle (mitosis) in order to overcome hepatocyte loss. In addition, the altered structure stimulates HSCs to overproduce ECM by up-regulation of TGF-β1 and others cytokines[19,45,46]. If liver injury is terminated, regression of fibrosis occurs by increased activity of collagenases and gelatinases and that will degrade the excessive ECM[19,45,46].

TAA-induced liver injury in male Wistar rats, following the protocol used in this study, was characterized by increased ALT levels, hepatocytes death following regenerative cell proliferation, inflammatory infiltration and fibrosis with collagen deposition, MMP-2 activation and increased TGF-β1 expression. Conventional and decaffeinated coffee and caffeine were effective to attenuate liver damage induced by TAA. This was evidencied as lower serum ALT levels, reduced collagen accumulation, fibrosis/inflammation scores and TGF-β1 expression when compared rats that received TAA only.

TGF-β1 is a pro-fibrotic cytokine produced by inflammatory cells, KCs and HSCs with multiple effects on matrix cellular turnover, hepatocellular proliferation and apoptosis, liver regeneration and inflammation and imunosuppression[47-49]. Thus, a decrease in TGF-β1 in animals that received conventional and decaffeinated coffee and caffeine might be linked to the reduction in collagen deposition and regression of the fibrosis. Interestingly, these findings indicate that caffeine is not the only hepatoprotective compound in coffee beverages, since animals treated with decaffeinated coffee also showed attenuated progression of liver damage. However, caffeine seems to play an important role because the fibrosis/inflammation scores were better in conventional coffee and caffeine groups.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-dependent endopeptidases that degrade most ECM components in both normal and pathophysiological processes, and their activity is tightly regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)[50]. MMPs are synthesized as inactive pro-forms which require subsequent cleavage in order to become active[50]. Based on their substrate specificity and structural similarity, MMPs are often classified into six subgroups: collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysin, membrane-type MMPs and other MMPs[51]. Perfect regulation of ECM degradation is essential for maintenance of tissue homeostasis, and an imbalance between TIMPs and MMPs rates may participate in liver damage and fibrosis progression/regression induced by hepatotoxicants[44]. In our study, animals that consumed conventional coffee had reduced activity of active MMP-2. Knittel et al (2000) observed increased of MMP-2 mRNA during the inflammatory process induced by CCl_4[52]. Thus, the reduced MMP-2 activity in the liver of rats that consumed conventional coffee could be related to attenuation of inflammation/fibrosis.

Various *in vitro* and *in vivo* studies report the ability of caffeine to modulate key enzymes of the hepatic microsomal system, especially induction of CYP1A2 in humans and CYP2C in mice or rats[53]. As consequence, coffee and caffeine have the potential to interfere with the metabolism of various drugs and hepatotoxicants and can modify the balance between activation and excretion of these substances[54]. However, 90% of the caffeine clearance is performed by CYP1A2, thus it is unlikely that caffeine interferes with TAA biotransformation TAA, as that is carried out by CYP2E1.

Oxidative stress can cause cytotoxicity, mutagenicity and/or carcinogenicity through increased lipid peroxidation, oxidative DNA damage and saturation of cellular antioxidant defenses[55]. Cells have defense mechanisms against high levels of free radicals, *i.e.* anti-oxidants that prevent or delay the oxidation of a specific substrate, preventing the excessive formation of reactive oxygen species (ROS). These antioxidants may have enzymatic or non enzymatic activity[56]. Among them are the enzymes superoxide dismutase (SOD) catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione reductase[57]. Among non-enzymatic molecules are ascorbic acid, vitamin E, vitamin B, beta carotene and glutathione (GSH), a tripeptide with a thiol group[55,58]. The antioxidant action of caffeine is inconclusive. Rossowaska and Nakamoto (1994) analyzed the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GSH-Px) in liver and heart of rats treated with caffeine for 22 and 30 days and found increased SOD activity only in the heart[59]. Moutaery et al. (2003) reported an increase in lipid

peroxidation induced by head trauma in the brain of mice treated with caffeine[60]. Thus, conventional and decaffeinated coffee and caffeine could act as antioxidant agents by preventing glutathione depletion in the liver and protecting against toxicity TAA toxicity.

In conclusion, both conventional and decaffeinated coffee and 0.1% caffeine are protective against TAA-induced liver injury, suggesting that not only caffeine, but other components in the coffee beverage are related to hepatoprotection in male Wistar rats.

Acknowledgements

This study was supported by FAPESP (07/54858-5; 08/50985-5; 09/50890-7) and CNPq. (474572/2008-0; 301585/2009-1). Furtado, KS, Prado, MG and Barbisan LF were recipient a fellowship from FAPESP and/or CNPq. The authors would like to thank Paulo Wagner Pires, M.Sc. for the critical revision of the manuscript.

References

1. Gressner OA. Less Smad2 Is Good for You! A Scientific Update on Coffee's Liver Benefits. Hepatology. 2009; 50 (3): 970-9.
2. Muriel P. Arauz J. Coffee and liver diseases. Fitoterapia. 2010; 81:297–305.
3. Catalano D. Martines GF. Tonzuso A. Pirri C. Trovato FM. Trovato GM. Protective role of coffee in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), Dig Dis Sci. 2010; 10: 1143-3.
4. Leung WW. Ho SC. Chan HL. Wong V. Yeo W. Mok TS. Moderate coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B chronic carriers: a case-control study. J Epidemiol Community Health. 2010 [Epub ahead of print].
5. Costentin, C.E., Roudot-Thoraval, F., Zafrani, E-S., Medkour, F., Pawlotsky, J-M., Mallat, A., Hézode, C., Association Of Caffeine Intake and Histological Features of Chronic Hepatitis C, Journal of Hepatology (2010), in press.
6. Corrao G. Zambon A. Bagnardi V. D'Amicis A. Klatsky A. Coffee, Caffeine, and the Risk of Liver Cirrhosis. AEP 2001; 11(7): 458-465.
7. Kurozawa Y, Ogimoto I, Shibata A, Nose T, Yoshimura T, Suzuki H, et al. Coffee and risk of death from hepatocellular carcinoma in a large cohort study in Japan. Br J Cancer 2005;93:607-610.
8. Shimazu T., Tsubono Y., Ohmori K., Koizumi Y., Nishino Y., Shibuya D., Tsuji I . Coffee consumption and the risk of primary liver cancer: pooled analysis of two prospective studies in japan. Int J Cancer, 2005; 116(1): 150-4.
9. Higdon J.V. Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. Crit Rev Food Sci Nutr. 2006; 46(2):101-23.
10. Bravi F. Bosetti C. Tavani A. Bagnardi V. Gallus S. Negri E. et al. Coffee Drinking and Hepatocellular Carcinoma Risk: A Meta-Analysis. HEPATOLOGY. 2007; 46 (2): 430-35.
11. Arab L. Epidemiologic evidence on coffee and cancer. Nutr Cancer. 2010; 62(3):271-83.
12. Modi AA. Feld JJ. Park Y. Kleiner DE. Everhart JE. Liang TJ. Hoofnagle JH. Increased Caffeine Consumption Is Associated with Reduced Hepatic Fibrosis. Hepatology. 2010; 51:201-9.

13. Lee KJ, Choi JH, Jeong HG. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. Food Chem Toxicol 2007;45:2118-2125.
14. Poyrazoglu OK. Bahcecioglu IH Ataseven H. Metin K. Dagli AF. Yalniz MY. Ustundag B. Effect of Unfiltered Coffee on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Rats. Inflammation. 2008; 31 (6): 408-13.
15. Shin JW. Wang JH. Kangb JK. Sona CG. Experimental evidence for the protective effects of coffee against liver fibrosis in SD rats. J Sci Food Agric. 2010; 90: 450–5.
16. Shi H, Dong L, Zhang Y, Bai Y, Zhao J, Zhang L. Protective effect of a coffee preparation (Nescafe pure) against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. Clin Nutr. 2010; 29(3):399-405.
17. Ozercan IH. Dagli AF. Ustundag B. Ozercan MR. Bahcecioglu IH. Çelik H. et al. Does instant coffee prevent acute liver injury induced by carbon tetrachoride (CCl4)? Hepatol Res. 2006;35:163-8.
18. Anselmi K. Subbotin VM. Nemoto E. Gandhi CR. Accelerated reversal of carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats by the endothelin receptor antagonist TAK-044. J Gastroenterol Hepatol. 2002; 17:589-97.
19. Saile B. Ramadori G. Inflammation, damage repair and liver fibrosis-role of cytokines and different cell types. Z Gastroenterol. 2007; 45: 77-86.
20. Natarajan SK. Thomas S. Ramamoorthy P. Basivireddy J. Pulimood AB. Ramachandran A. et al. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. J Gastroenterol Hepatol. 2006; 21(6):947-57.
21. Manibusan MK. Odin M. Eastmond DA. Postulated Carbon Tetrachloride Mode of Action: A Review. Journal of Environmental Science and Health Part C. 2007; 25:185–209.
22. Díez-Fernádez C. Boscá L., Fernández-Simón L., Alvarez A., Cascales M., Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. Hepatology, 1993; 18(4): 912-8.
23. Morio LA, Chiu H, Sprowles KA, Zhou P, Heck DE, Gordon MK, Laskin DL. Distinct roles of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in acute liver injury

induced by carbon tetrachloride in mice. Toxicol Appl Pharmacol 2001; 172: 44-51.

24. Nakade Y, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A. Involvement of endogenous CRF in carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. Am J Physiol Regul Integr CompPhysiol 2002; 282: R1782-1788.
25. Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Wongpoomchai R, Chusiri Y, Gonzalez FJ, Fukushima S. Role of CYP2E1 in thioacetamide-induced mouse hepatotoxicity Toxicology and Applied Pharmacology 228 (2008) 295–300.
26. Wang T, Shankar K, Ronis MJ, Mehendale HM. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. J Pharmacol Exp Ther 2000; 294: 473-479.
27. Ramaiah SK, Apte U, Mehendale HM. Cytochrome P4502E1 induction increases thioacetamide liver injury in diet-restricted rats. Drug Metab Dispos 2001; 29: 1088-1095.
28. Hosaka S. Kawa S. Aoki Y. Tanaka E. Yoshizawa K. Karasawa Y. et al. Hepatocarcinogenesis inhibition by caffeine in ACI rats treated with 2-acetylaminofluorene. Food and Chem. Toxicol. 2001; 39: 557-561.
29. Hasegawa R. Ogiso T. Imaida K. Shirai T. Ito N. Analysis of the potential carcinogenicity of coffee and its related compounds in a médium-term liver bioassay of rats. Fd Chem Toxic. 1995;33:15-20.
30. Silva JF. Bidinotto LT. Furtado KS. Salvadori DM. Rivelli DP. Barros SB. et al. Maté attenuates DNA damage and carcinogenesis induced by diethylnitrosamine and thermal injury in rat esophagus. Food Chem Toxicol. 2009; 47(7):1521-9.
31. Ozer J. Ratner M. Shaw M. Bailey W. Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. Toxicology. 2008; 245(3):194-205.
32. Bruck R. Weiss S.Traister A. Zvibel I. Aeed H. Halpern Z. Oren R. Induced hypothyroidism accelerates the regression of liver fibrosis in rats. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2007; 22: 2189–94.
33. Junqueira, L. C., Bignolas, G. & Brentabi, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochemical Journal. 1979; 11: 447–55.
34. Delella FK. Justulin Jr LA. Felisbino SL. Finasteride treatment alters MMP-2 and -9 gene expression and activity in the rat ventral prostate. International Journal of Andrology. 2010; 33: e114–e22

35. Pinheiro F, Faria RR, de Camargo JL, Spinardi-Barbisan AL, da Eira EF, Barbisan LF. Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom Agaricus blazei Murrill in the rat. Food Chem. Toxicol. 2003; 41(11): 1543-50.

36. Pires PW, Furtado KS, Justullin LA Jr, Rodrigues MA, Felisbino SL, Barbisan LF. Chronic ethanol intake promotes double gluthatione S-transferase/transforming growth factor-alpha-positive hepatocellular lesions in male Wistar rats. Cancer Sci. 2008; 99(2):221-8.

37. Paroni R. De Vecchi E. Cighetti G. Et al. HPLC with o-phtalaldeyde precolumm derivatization to mesure total, oxided, and protein-bound glutathione in blood, plasma, and tissue. Clinical Chemistry, Washington, v. 41, n.3, p. 448-454, 1995.

38. Furtado KS. Pires PW. Justulin Jr LA. Rodrigues MA. Felisbino SL. Barbisan LF. Metalloproteinases 2 and -9 activity during promotion and progression stages of rat liver carcinogenesis. J Mol Histol. 2009; 40(1):1-11.

39. Ruhl CE, Everhart JE. Coffee and caffeine consumption reduce the risk of elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. Gastroenterology 2005, 128: 24-32.

40. Tverdal A. Skurtveit S. Coffe intake and mortallity from liver cirrhosis. Ann Epidemiol. 2003; 13:419-23.

41. Freedman ND. Everhart JE. Lindsay KL. Ghany MG. Curto TM. Shiffman ML. Coffee intake is associated with lower rates of liver disease progression in chronic hepatitis C. Hepatology. 2009; 50(5):1360-9.

42. Li X.Benjamin IS. Alexander B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. J. Hepatol. 2002; 36: 488–93.

43. Kang JS. Wanibuchi H. Morimura K. Puatanachokchai R. Salim EI. Hagihara A. et al. Enhancement by estradiol 3-benzoate in thioacetamide- induced liver cirrhosis os rats. Toxicol Sci. 2005; 85 (1): 720-6.

44. Consolo M. Amoroso A. Spandidos DA. Mazzarino MC. Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease (Review). International J Mol Medicine. 2009; 24: 143-52.

45. Kisseleva T. Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. J Gastroenterol Hepatol. 2006; 21 (3): S84-S7.

46. Malato Y. Sander LE. Liedtke C. Al-Masaoudi M. Tacke F. Trautwein C. Beraza N. Hepatocyte-specific inhibitor-ofkappaB-kinase deletion triggers the innate immune response and promotes earlier cell proliferation during liver regeneration. Hepatology. 2008; 47: 2036-50.

47. Cerwenka A. Swain SL. TGF-beta1: immunosuppressant and viability factor for T lymphocytes. Microbes Infect.. 1999; 1(15):1291-6.

48. Bissell DM. Chronic liver injury, TGF-beta, and cancer. Exp Mol Med. 2001; 33(4):179-90.

49. Tian M. Schiemann WP. The TGF-beta paradox in human cancer: an update. Future Oncol. 2009; 5(2):259-71.

50. Chakraborti S. Mandal MS. Mandal A. Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. Molecular and Cellular Biochemistry. 2003;253:269-85.

51. Vihinen P. Ala-aho R. Kähäri V-M. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer. Curr Cancer Drug Targets. 2005;5:203-220.

52. Knittel T. Mehde M. Grundmann A. Saile B. Scharf J-G. Ramadori G. Expression of metalloproteinases and theis inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. Histochem Cell Biol. 2000;113:443-53.

53. Kot M. Daniel WA. Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat. Pharmacol Rep. 2008;60 (6): 789-97.

54. Carrillo JA. Benitez J. Clinically significant pharmacokinetic interactions between dietary caffeine and medications. Clin Pharmacokinet. 2000; 39 (2): 127-53.

55. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species. Toxicology. 2000; 153 (1-3): 83-104.

56. Bergendi L. Benes L. Duracková Z. Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life Sci. 1999; 65 (18-19): 1865-74.

57. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). Free Radic Res. 1999; 4: 261-72.

58. Costagne V. Gautschi M. Lefevre K. Posada A. Clarke PGH. Relationship between neuronal death and the cellular redox status focus on the developing nervous system. Progr Neurobiol. 1999; 59: 397-423.

59. Rossowska MJ. Nakamoto T. Effects of chronic caffeine feeding on the activities of oxygen free radical defense enzymes in the growing rat heart and liver. Experientia. 1994; 50: 465-8.

60 Moutaery KA. Deed SA. Khan HA. Tariq,M. Caffeine impairs short-term neurological outcome after concussive head injury in rats. Neurosurgery. 2003; 53: 704-12,.

Table 1: Data from absolute (g) and relative liver weight (%) and serum alanine aminotransferase (ALT) levels (U/mL) in different groups at the end of week 8[1].

Groups[2]	Number of rats	Absolute Liver Weight (g)	Relative Liver Weight (g)	ALT (U/mL)
G1	12	$14.57 \pm 1.42^{b,c,d,e}$	3.34 ± 0.37	49.00 ± 3.66^{b}
G2	12	10.98 ± 1.61^{a}	3.05 ± 0.28	$1010.3 \pm 120.23^{a,c,d,e}$
G3	12	11.10 ± 1.06^{a}	3.08 ± 0.26	$274.50 \pm 179.39^{a,b}$
G4	12	11.11 ± 0.94^{a}	3.02 ± 0.16	$403.57 \pm 181.19^{a,b}$
G5	12	11.67 ± 1.68^{a}	3.19 ± 0.33	$175.57 \pm 66.02^{a,b,c}$

[1] Values are mean ± SD; [2] See experimental design; [a,b,c,d,e] Different from G1, G2, G3, G4 and G5 respectively; $p < 0.001$.

Table 2: Data from incidence of liver injury (scale 0-3) and inflammation (scale 0-3) in the liver of different groups at the end of week 8[1].

Groups[1]	Centrilobular Lesions Score				Inflammation Score				Score mean[2]
	0	1	2	3	0	1	2	3	
G1	12 (100%)^{b,c,d,e}	0^{c,e}	0^{b,d}	0	12 (100%)^{b,c,d,e}	0^{c}	0	0	0 ^{b,c,d,e}
G2	0^{a}	3 (27%) ^{c,e}	6 (54%) ^{a}	3 (25%)	0^{a}	0^{c}	8 (67%)	4 (33%)	2,17 ± 0,55^{a,c,d,e}
G3	0^{a}	9 (75%) ^{a,b}	1 (9%)	2 (17%)	0^{a}	7 (58%)^{a,b}	5 (42%)	0	1,33 ± 0,62^{a,b}
G4	0^{a}	5 (42%)	5 (42%) ^{a}	2(16%)	0^{a}	3 (25%)	5 (42%)	4 (33%)	1,83 ± 0,59^{a,b}
G5	0^{a}	9 (75%) ^{a,b}	2 (17%)	1 (9%)	0^{a}	5 (42%)	4 (33%)	3 (25%)	1,58 ± 0,67^{a,b}

[1] See experimental design, [2] Values are mean ± SD, ^{abcde} Different from G1, G2, G3, G4 and G5 respectively; $p < 0,05$ (lesion score) and $p < 0,001$ (inflammation and mean scores).

Legend of Figures

Figure 1: A-D) Liver section HE-stained showing liver injury (scale 0, 1, 2 and 3 respectively). E and F – Picrossirius staining showing non-treated and TAA-treated groups (G1 and G2), respectively.

Figure 2: Picrosirius analysis showing collagen volume fraction mean (%) of the different groups at the end of week 8. [a,b,c,d,e] Difference from G1, G2, G3, G4 and G5 groups respectively, $p<0.01$.

Figure 3: PCNA labeling index (LI%) and apoptotic index (%) of the experimental groups at the end week 8. [a,b,c] Different from G1, G2 and G3 groups respectively; $p<0.05$.

Figure 4: PCNA and cleaved caspase-3 positive hepatocytes (arrow, A and B respectively); Immunohistochemistry expression of MMP-2 (C and D) and TGF-β1 (E and F) in TAA-treated animal (G2).

Figure 5: Mean levels of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) in all experimental groups. [a,b] Different from G1 and G2, respectively, $p<0.03$ for GSH and $p<0.04$ for GSSG).

Figure 6: A - Densitometric analysis of gelatinolytic bands for active form and total MMP-2. The values are expressed as average of relative IOD, normalized to G1 group values (G1 = 1). B - Representative gelatin zymography from liver samples after 8 weeks of experiment. The clear bands of 72, 64 and 59 kDa corresponds to the pro-MMP-2, intermediate-MMP-2 and active-MMP-2, respectively. [a,b,c,d,e] Different from G1, G2, G3, G4 and G5 groups respectively; $p \leq 0.004$.

Figure 7: A - Densitometric analysis of TGF-β expression by Western Blotting in TAA-treated groups. The values are expressed as average of relative IOD, normalized to G2 group values (G2 = 1). [b,c,d,e] = Different from G2, G3, G4

and G5 respectively, $p \leq 0.001$. B - Representative bands of the experimental groups for TGF-β1 and C- calibrator β-actin.

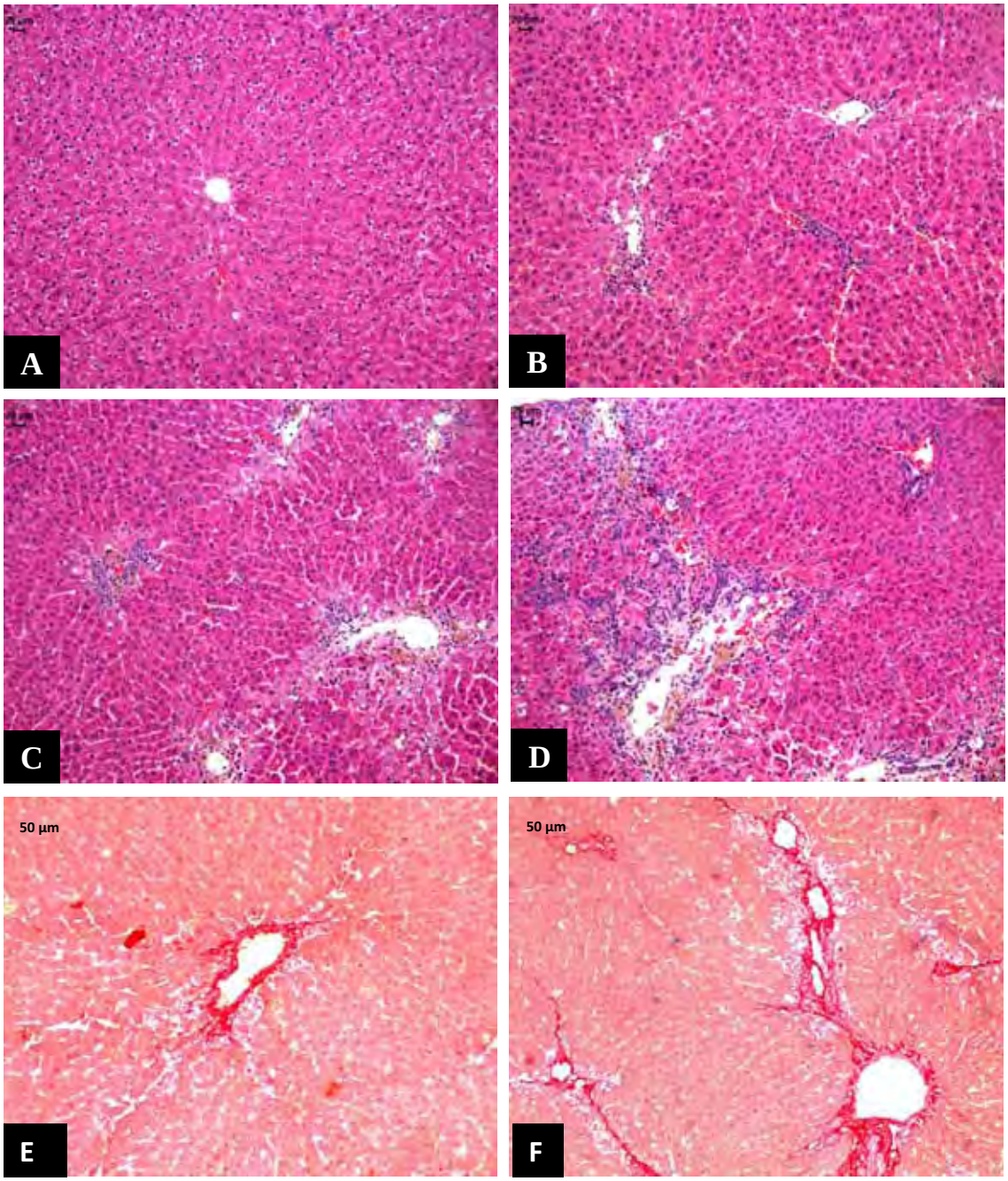


Figure 1

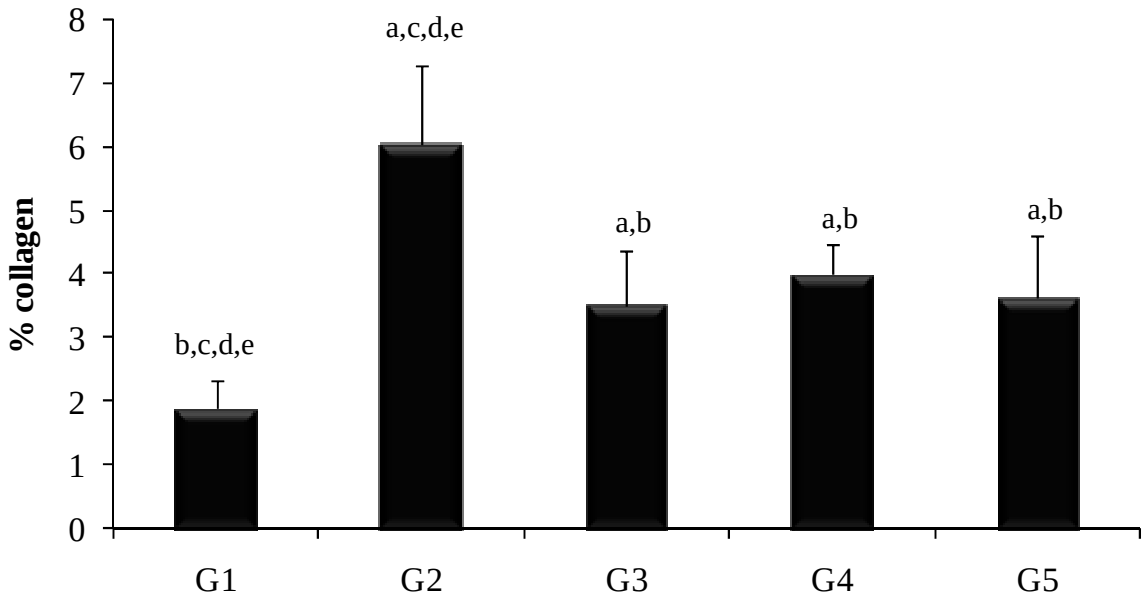


Figure 2

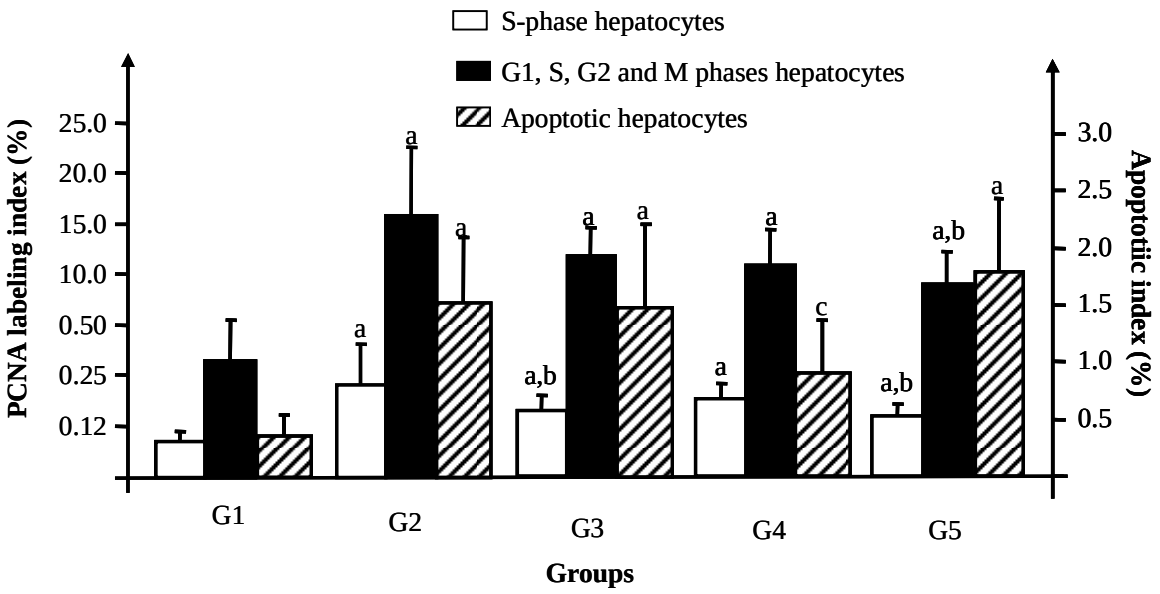

S-phase hepatocytes
G1, S, G2 and M phases hepatocytes
Apoptotic hepatocytes
PCNA labeling index (%)
25.0
20.0
15.0
10.0
0.50
0.25
0.12
Apoptotiic index (%)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
a
a
a
a,b
a
a
a
a
c
a,b
a,b
a
G1
G2
G3
G4
G5
Groups

Figure 3

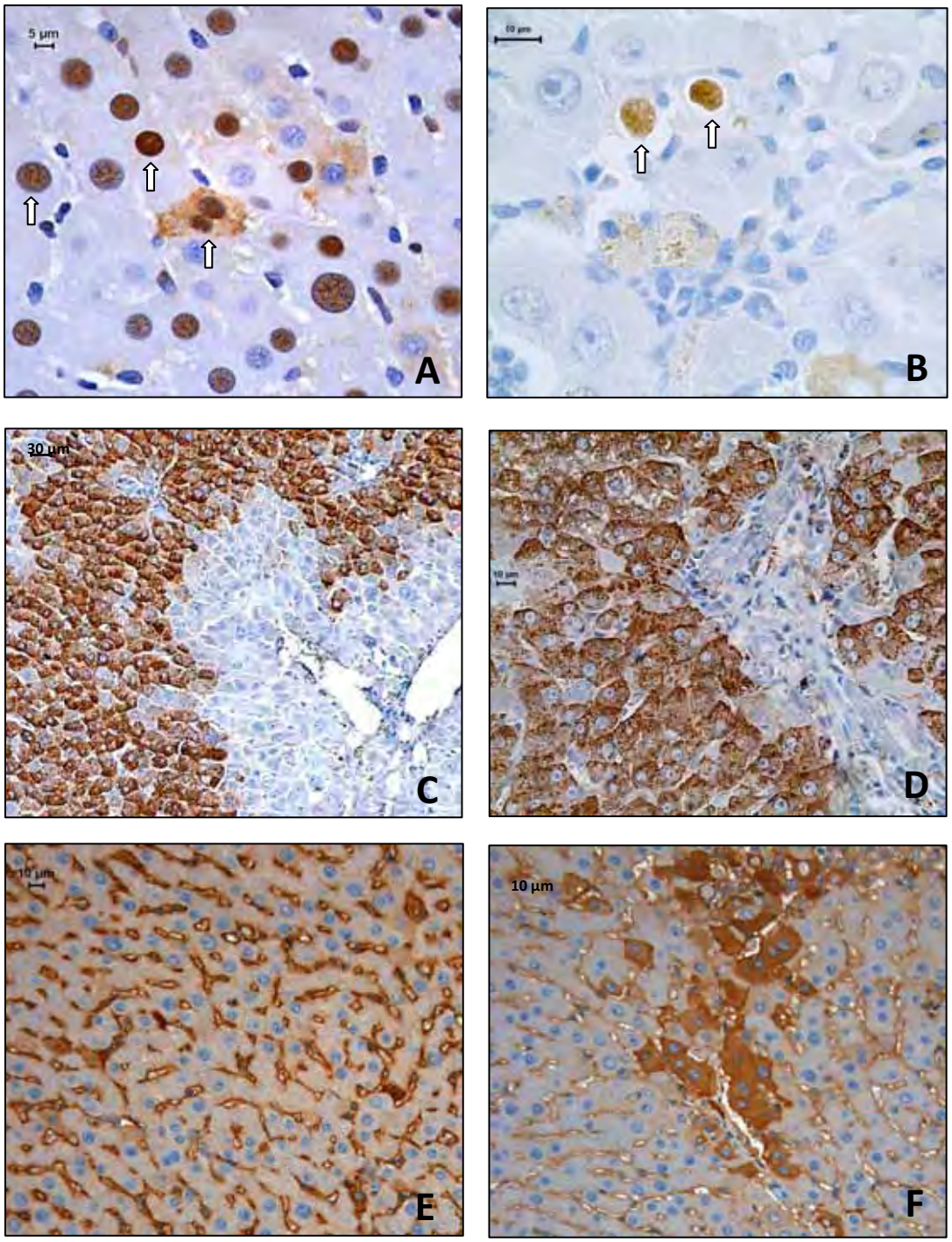


Figure 4

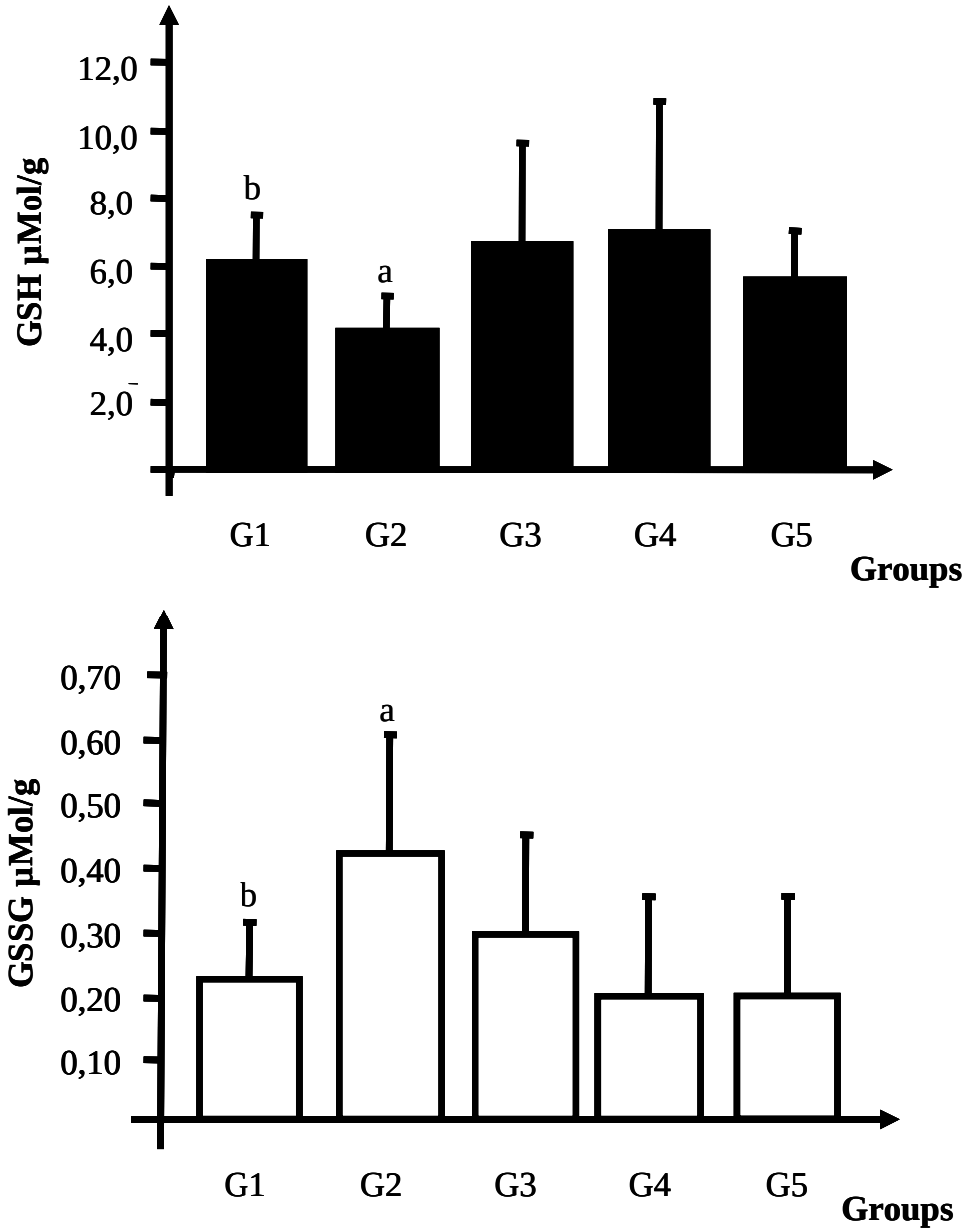

12,0
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
GSH µMol/g
b
a
G1
G2
G3
G4
G5
Groups
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
GSSG µMol/g
a
b
G1
G2
G3
G4
G5
Groups

Figure 5

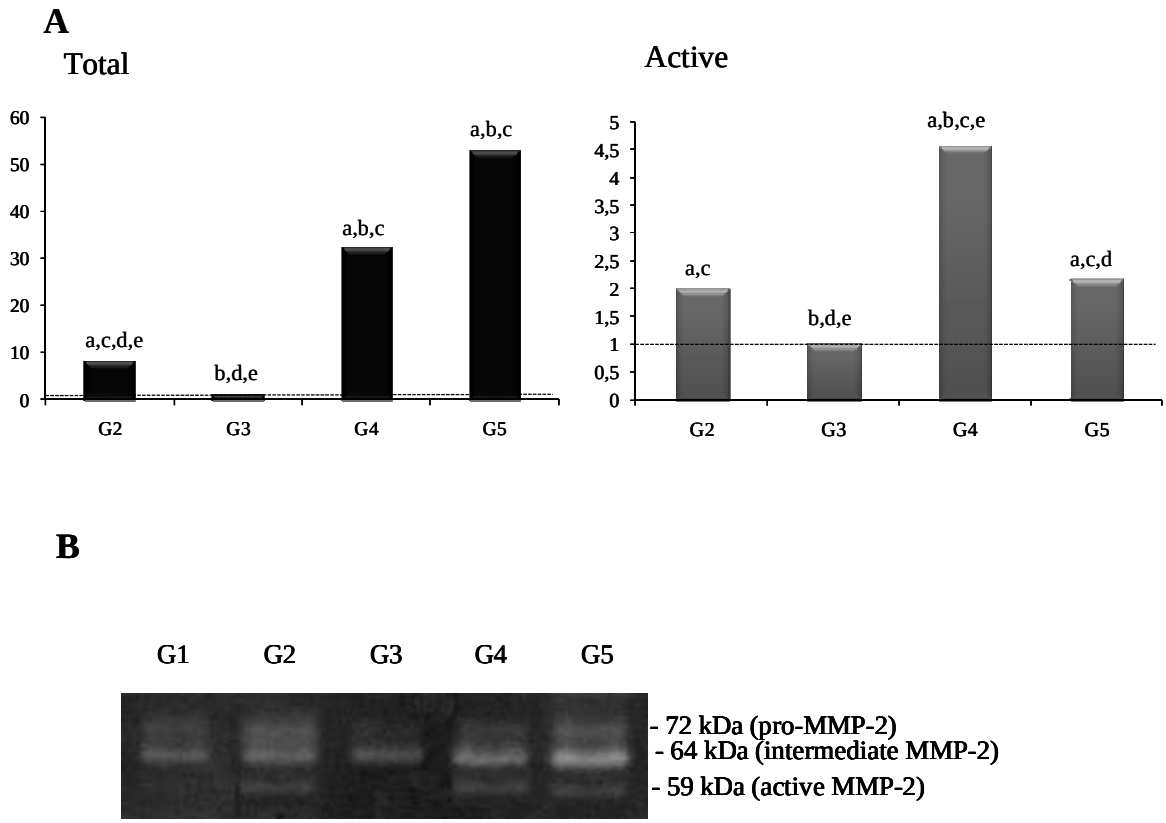
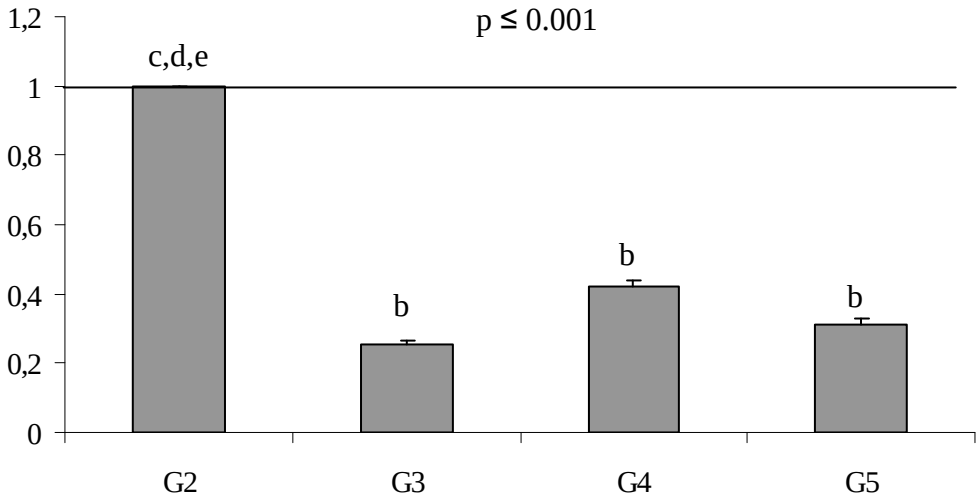
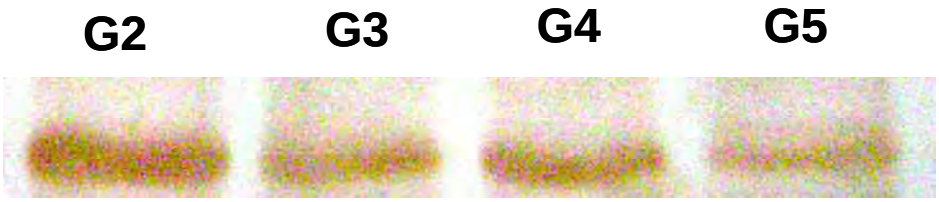

A
Total
Active
60
50
40
30
20
10
0
a,c,d,e
b,d,e
a,b,c
a,b,c
G2
G3
G4
G5
5
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
a,c
b,d,e
a,b,c,e
a,c,d
G2
G3
G4
G5
B
G1
G2
G3
G4
G5
- 72 kDa (pro-MMP-2)
- 64 kDa (intermediate MMP-2)
- 59 kDa (active MMP-2)

Figure 6

A



B - TGF-β1



C - β-actin

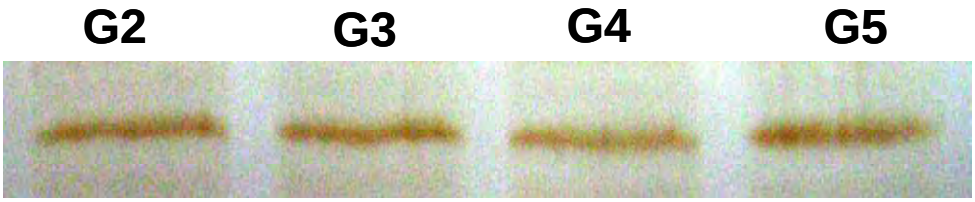


Figure 7

Artigo 2

Ingestão de café e cafeína previne a evolução da fibrose e carcinogênese hepática em ratos Wistar.

Kelly S. Furtado[1], Jossimara Polletini[1], Marcos C. Dias[1], Luís F. Barbisan[2*].

[1] Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP - Botucatu, 18618-970, São Paulo, Brazil.

[2] Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências/UNESP - Botucatu, 18618-970, SP, Brazil.

*Correspondência para:

Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan (barbisan@bb.unesp.br)

Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências.

UNESP, Universidade Estadual Paulista

18618-900, Botucatu, SP, Brasil

Resumo

O café e a cafeína são dois potenciais agentes preventivos contra o desenvolvimento ou avanço dos processos de fibrose/cirrose e carcinogênese hepática em humanos, entretanto suas ações são controversas. Então, este estudo avaliou os efeitos da ingestão de três preparados de café e duas concentrações de cafeína sobre os processos de fibrose e de hepatocarcinogênese química induzidos no modelo DEN/CCl_4. Para tanto, 90 ratos Wistar machos foram distribuídos em 6 grupos, sendo que todos receberam dose única i.p. de dietilnitrosamina (DEN, 200 mg/kg p.c.) e aplicação semanal i.g. de tetracloreto de carbono (CCl_4, 0,5 mg/kg p.c., até a 10ª semana e 1,0 mg/kg até a 24ª semana.). Uma semana após a iniciação com a DEN, os animais dos grupos G2-G6 receberam cafeína 0,1% (G2), cafeína 0,2% (G3), café convencional (G4), café instantâneo (G5) e café descafeinado (G6) *ad libitum* durante cinco dias por semana. Ao final da 25ª semana, os animais foram eutanasiados para coleta do sangue (análises séricas) e do fígado para análise histológica (HE), histoquímica (picrossirius e reticulina), imunoistoquímica (GST-P, PCNA, caspase-3 e TGF-β1), PCR em tempo real (colágenos I e III e TGF- β1) e *Western Blotting* (TGF- β1, bax e bcl-2). De maneira geral, os grupos tratados com café/cafeína apresentaram menores níveis de ALT, porcentagem de área ocupada por fibras de colágeno I e III e expressão do RNAm do colágeno I. Os grupos G2 e G5 apresentaram menores áreas ocupadas por lesões GST-P positivas. Não houve diferença na expressão do RNAm e da proteína TGF- β1. Esses dados mostram que o café convencional, o descafeinado e a cafeína exercem efeito hepatoprotetores contra o avanço da fibrose. Além disso, o café instantâneo e a cafeína a 0,1% exercem efeito de quimioproteção no fígado de ratos Wistar tratados com DEN/CCl_4.

Palavras-chave: café/cafeína, fibrose, quimioproteção, colágenos I e III

Introdução

A maioria das doenças hepáticas crônicas segue um caminho comum, ou seja, inicia-se com processos inflamatórios, passam pela fibrose e evoluem para a cirrose, sendo associadas a altos índices de morbidade e mortalidade [1,2].

A fibrose e cirrose hepáticas representam as conseqüências de um processo regenerativo sustentado em resposta à injúria persistente, de diversas etiologias, como a infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV, sigla do termo em inglês) ou consumo exagerado de bebidas alcoólicas. A cirrose é o resultado final do processo de fibrose e expressa a subversão do parênquima com a formação de nódulos e conseqüente comprometimento da função hepática[3]. O processo fibrótico é resultado de uma agressão hepática e consiste em acúmulo de proteínas da matriz extracelular (MEC), principalmente colágenos (tipos I e III), proteoglicanos e glicoproteínas, gerando modificação da arquiterura hepática e, consequentemente, diminuição da função hepática[4]. A fibrose hepática é iniciada por uma cascata de eventos resultantes de danos hepáticos, recrutamento de células inflamatórias e ativação de células produtoras de colágeno, como as células estreladas ou de Ito [5,6].

A fibrose e posterior cirrose crônica pode evoluir para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (HCC), principal neoplasia hepática primária em humanos [3,7]. O HCC é o quinto tipo mais comum de neoplasia maligna no mundo, correspondendo a cerca de 85 a 90% do número de casos de neoplasias hepáticas, e é considerada uma doença com prognóstico ruim e de baixa sobrevida para os pacientes [8,9]. Devido a isso se tem buscado estratégias preventivas contra o desenvolvimento ou progressão do processo fibrótico e carcinogênico. Estudos epidemiológicos recentes apontam o café e/ou cafeína como agentes benéficos ao fígado, pois apresentam propriedades antioxidantes e previnem a evolução de doenças hepáticas como a fibrose/cirrose, hepatites B e C e risco de desenvolvimento de HCC [10,11]. Porém, o papel café *per si* e de seus componentes na prevenção de doenças hepáticas humanas ainda é controverso e inconclusivo [10,12, 13].

Os estudos epidemiológicos relatam possível atividade preventiva do consumo de café sobre o desenvolvimento de fibrose/cirrose em consumidores de bebidas alcoólicas e sobre o desenvolvimento do HCC em portadores ou não de virus das hepatites B e C[11,12,14]. Misik e colaboradores (2010) relataram, em estudo populacional, que o consumo de café filtrado convencional contribui para a prevenção de danos

oxidativos no DNA[14]. Leung e colaboradores (2010), em estudo de caso-controle com indivíduos de Hong-Kong, reportaram que portadores do vírus da hepatite B (VHB) que consomem café moderadamente apresentam menor chance de desenvolver HCC[11]. Muriel e Arauz (2010), em artigo de revisão, sugerem que o consumo de cerca de três xícaras/dia de café reduz o risco de danos hepáticos causados por diversos agentes etiológicos. Entretanto, os autores relatam que ainda não foi descoberto qual (is) dos diversos componentes do café (cafeína, cafestol, kawheol e as substâncias antioxidantes presentes nos grãos) é (são) o (s) responsável (is) por esta ação benéfica[15]. Klatsky e Armstrong (1992) mostraram que pessoas que consomem quatro xícaras diárias de café apresentam cinco vezes menos chance de desenvolver cirrose alcoólica do que as pessoas que não tomam café, pois existe uma relação inversa entre o consumo de café e o risco de cirrose provocada pelo álcool[13]. Corrao et al. (2001) sugerem que somente o café, e não outras bebidas que contenham cafeína, deva inibir o início da cirrose hepática[12]. Entretanto, Klatsky et al., (2006) não encontraram associação entre o consumo de café e o desenvolvimento de cirrose não-alcoolica[16]. Porém, Costentin e colaboradores (2010) relataram que a cafeína mais do que o café em si contribui para a redução da progressão da fibrose por diminuir os focos necrose e inflamação no fígado[10].

Estudos experimentais mostram que o café instântaneo reduz a fibrose induzida pelo CCl_4 em ratos da linhagem Sprague-Dawley [17-19]. Lee e colaboradores (2006) relataram que o pré-tratamento com cafestol e kaweol leva a inibição da peroxidação lipídica e redução da depleção de GSH hepático em camundongos que receberam CCl_4[20]. Em contrapartida, Poyrazoglu e colaboradores (2008) relatam que o café Turco não filtrado potencializou o efeito hepatotóxico do CCl_4 em ratos da linhagem Sprague-Dawley[21].

Do ponto de vista da carcinogênese, existem poucos estudos sobre os efeitos do café a da cafeína no processo de hepatocarcinogênese química. Hasegawa e colaboradores (1995) não observaram efeito protetor da ingestão de café (convencional, instantâneo ou descafeinado) e da cafeína sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (LPN) no fígado de ratos Fischer 344[22]. Morii e colaboradores (2009) observaram fraco efeito protetor sobre estresse oxidativo no fígado de camundongos que receberam café instantâneo, em relação ao risco de desenvolvimento de câncer[23]. Silva-Oliveira e colaboradores (2010) relataram que o extrato de café incorporado na

dieta reduziu de forma significativa o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (LPN) no fígado de ratos Wistar[24].

A maioria dos estudos experimentais indica ação protetora do café e/ou da cafeína sobre o processo de fibrose e carcinogênese hepática, entretanto, os dados experimentais são de difícil comparação em virtude da dose e tipo de preparação do café utilizado. Assim, considerando-se que o café é uma das bebidas mais populares do mundo e que a fibrose/cirrose hepática pode favorecer o desenvolvimento do HCC, este estudo visou analisar os efeitos de diferentes preparações de café (convencional, instantâneo e descafeinado) e da cafeína no processo de fibrose e progressão da hepatocarcinogênese química em ratos Wistar no modelo tratados com DEN/CCl_4.

Material e Métodos

Animais e ambiente de experimentação

Foram utilizados 90 ratos Wistar com quatro semanas de idade. Todos os animais foram adquiridos do CEMIB/UNICAMP (Campinas-SP) e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Os animais foram mantidos em cinco animais por gaiola de polipropileno de 41x34x16 cm, com tampa de aço inox na forma de grade, e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada, sendo as trocas das gaiolas e da maravalha realizadas três vezes por semana. Durante toda a fase de experimentação foram controladas as condições ambientais do biotério: temperatura (22 $\pm$ 2o C), umidade relativa do ar (55 $\pm$ 10%), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão do ar contínua.

Todos os animais receberam ração comercial (Nuvilab CR1 - Nuvital, PR), e água filtrada ou as soluções de café e cafeína *ad libitum*. Durante o experimento, os animais passaram por avaliação clínica semanal e foram pesados semanalmente, sendo o consumo de ração e água registrados semanalmente ao longo do experimento.

Reagentes

A dietilnitrosamina (DEN, Sigma-Aldrich, EUA) foi administrada em dose única i.p. de 200 mg/kg de p.c., diluída em NaCl 0,9%, para iniciar o processo de carcinogênese hepática[25]. O tetracloreto de carbono (CCl_4, Sigma-Aldrich, EUA) foi administrado em dose única semanal (na segunda-feira, 9:00 hrs) de 0,5 ml/kg da 2ª a

10ª semana e 1,0 ml/kg, diluído em óleo de milho, até a 24ª semana do experimento para indução de fibrose/cirrose[26]. A cafeína pura (Sigma-Aldrich, EUA Sigma, EUA) foi administrada nas concentrações de 0,1 e 0,2%, diluída em água filtrada, cinco dias por semana[27]. Os cafés convencional e descafeinado (8g de pó em 140 mL de água fervente) e o instantâneo (2% em água filtrada) foi administrado aos animais cinco dias por semana (segunda a sábado, no período noturno) da 2ª a 25ª semanas do experimento[22].

Delineamento Experimental

Os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais. Todos os animais foram submetidos ao modelo DEN/CCl_4 (Iwai et al., 2002, com modificações). Uma semana após a iniciação com a DEN, os animais dos grupos G2-G6 receberam cafeína 0,1% (G2), cafeína 0,2% (G3), café convencional (G4), café instantâneo (G5) e café descafeinado (G6) *ad libitum* durante cinco dias por semana da 2ª a 25ª semanas do experimento. A eutanásia dos animais foi realizada ao final da 25ª semana do experimento pela abertura da parede abdominal e do diafragma, seguida da secção da veia cava inferior, após jejum de 12 horas e anestesia com dose única i.p. de 30 mg/kg p.c. com pentobarbital sódico. Antes da eutanásia, foram coletados 2-3 mL de sangue por punção cardíaca para obtenção de soro para determinação dos níveis da enzima alanina aminotransferase (ALT).

O fígado foi retirado, lavado em solução fisiológica e pesado. Fragmentos hepáticos foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24 h ou armazenados a -70^0C em RNA *later* (Qiagen, EUA). Após o processamento histológico (material fixado), cortes histológicos de 3-4 µm de espessura foram obtidos e utilizados para análises histológicas em hematoxilina-eosina (HE) e picrossírius e reticulina ou marcação imunoistoquímica de glutationa S-transferase, forma placental (GST-P), fator de crescimento e transformação beta 1 (TGF-β1), caspase-3 clivada e para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) utilizando-se sistema de polímeros (NovoLink Max Polymer Detection System, Leica/Novocastra). Nos cortes histológicos corados em H-E, as lesões pré-neoplasicas e neoplásicas hepáticas foram identificadas e classificadas conforme característica fenotípica predominante [28,29].

Análise de cafeína e ácido clorogênico nas preparações de café e de cafeína no soro dos animais

A determinação dos níveis de cafeína e ácido clorogênico nos preparados de café (convencional, instantâneo e descafeinado) foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC, sigla do termo em inglês), utilizando cromatógrafo líquido (Sistema LC10 - Shimadzu®, Japan) acoplado aos detectores ultravioleta (UV) e fluorescência, de acordo com da Silva e colaboradores (2009)[30]. A quantificação dos níveis de cafeína no soro dos animais também foi realizada por HPLC seguindo a metodologia descrita por Paroni e colaboradores (1995)[31].

Quantificação de LPN positivas para GST-P

O número e a área agregada de lesões pré-neoplásicas (LPN) e neoplásicas hepáticas GST-P positivas e a área dos fragmentos hepáticos foram determinadas utilizando-se o sistema de análise de imagem KS300 (Carl Zeiss, Alemanha)[32]. Foram analisados o número de lesões hepáticas (LPN, adenomas e carcinomas) por área de fígado (número/cm^2) e a área agregada destas por área de fígado (mm^2/cm^2).

Determinação das taxas de proliferação celular e apoptose

Todos os hepatócitos PCNA positivos (núcleo em fase S fortemente corado) ou em apoptose (positivos para caspase-3 clivada) foram contados entre 2000 hepatócitos analisados dentro das LPN ou neoplásicas em objetiva de 40x [32].

Medida da área de fibras colágenas

Nos cortes de fígado corados por H-E foi avaliado o grau de fibrose em escala de I a III de acordo com critérios estabelecidos por Bruck e colaboradores (2007)[33].

A quantificação da área ocupada por fibras de colágeno tipos I e III foi realizada utilizando-se câmera digital acoplada ao microscópio e software de análise de imagem Leica Qwin Versão 3.1 para Windows TM. Foram medidos 15 campos aleatórios em cortes histológicos de fígado corados com picrossírius (objetiva de 20x) de todos os animais.

Avaliação da expressão gênica dos RNAm dos colágenos tipo I e III por Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa (RT - PCR).

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do MIQE: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment[34]. A extração do RNA foi realizada com o kit Illustra RNAspin (GE, EUA) segundo as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNase (Ambion, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico. O RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop (Thermo Scientific, EUA).

A transcrição reversa dos mRNAs obtidos do fígado foi realizada utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Para a reação foram utilizados 4 μL de Master Mix para a transcrição reversa ao qual foi adicionado 1 μg de RNA e o volume completado para 20 μL com água livre de nucleases. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 25 °C por 5 min., 42 °C por 30 min. seguido da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min.

Cada amostra de cDNA foi analisada com ensaios TaqMan (Life Technologies, EUA), contendo primers e sondas de hidrólise específicos para colágeno I, III (Applied Biosystems RN01463848_m1 e RN01437683_m1, respectivamente), TGF-β1 (Applied Biosystems Rn99999016_m1) e GAPDH (controle endógeno, Applied Biosystems 4352338E). Para cada reação, foram utilizados 10 μL de TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2X) (Life Technologies, EUA), 4 μL do produto da reação de transcrição reversa e o volume final ajustado para 20 μL com água livre de nucleases. Foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 10 min., seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15s e 60 °C por 1 min. As reações foram realizadas no Sistema de PCR em Tempo Real 7900 HT (Life Technologies, EUA). Os valores de ciclo de quantificação (Cq) foram calculados utilizando o software SDS 2.1, utilizando a configuração automática de *baseline* e um *threshold* de 0,2. O Cq refere-se ao ponto de encontro entre a curva de amplificação corrigida pelo *baseline* e o *threshold* (de acordo com o RDML, http://rdml.org)[35]. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Cq comparativo[36].

Western Blot para TGF-β1, bax e bcl-2

Fragmentos hepáticos de cerca de 300 mg foram coletados e congelados em nitrogênio liquido e, posteriormente, armazenados a -70°C. O processamento do Western Blot foi realizado segundo o protocolo estabelecido por Zeng e colaboradores (1999)[37], modificado. Resumidamente, os fragmentos hepáticos foram homogeneizados em tampão de extração (Tris-HCl 500mM pH 7,6; NaCl 0,2 M; Triton X-100 1%; CaCl2 10mM; Inibidor de protease 2µl/100ml) na proporção de 30 mg de tecido/100µl de tampão e mantidos a 4ºC durante 2 horas. Após este procedimento, o material extraído foi centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos a 4ºC e o sobrenadante coletado para dosagem de proteína, que foi realizada pelo método de Bradford em 495 nm utilizando-se de leitor de Elisa (Spectra Max 190).

Então, amostras foram fervidas a 90ºC por cinco min. e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% em condições redutoras (com betamercaptoetanol). Após a corrida, foi montado o sanduíche (esponja, duas folhas de papel filtro grosso Whatman, gel, membrana de nitrocelulose, duas folhas de papel filtro grosso Whatman, esponja) em uma cuba contendo tampão de transferência (Tris, glicina, metanol 20% e SDS 10%). Posteriormente, foi realizada a transferência a 4ºC durante 90 minutos a 300mA. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1h com leite desnatado a 10% em TBS-T (Tris 0,05 M, NaCl a 0,15 M, pH 7.2, acrescido de Tween 20 a 1%), incubada com anticorpo primário anti-TGF-β1 (1:1000 R&D Systems), anti-bax (1:200 Santa Cruz Biotechnology) ou anti-bcl2 (1:200 Santa Cruz Biotechnology, EUA), durante 1h e 30 min., lavada com TBS-T (3x de 20 min.), incubada com anticorpo secundário (1:1000 anti-mouse, Santa Cruz Biotechnology) marcado com peroxidase por 1h e revelada com DAB.

O peso molecular relativo das bandas foi determinado de acordo com o padrão de peso molecular marcado com biotina que foi corrido junto na eletroforese. Análises semiquantitativas por densitometria das bandas foram realizadas.

Análise estatística dos dados

Os dados relativos ao ganho de peso corpóreo, peso relativo do fígado, às análises bioquímicas, aos níveis de proliferação celular, apoptose, aos valores de número e porcentagem de área ocupada por LPN e neoplásicas GST-P positivas, às medidas de fibras colágenas, às análises da expressão de RNAm e proteínas foram analisados pela ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis. A incidência de LPN e de

neoplasias hepáticas foi avaliada pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fischer. O contraste entre os grupos para os testes de ANOVA e Kruskal-Wallis foi avaliado utilizando-se o teste de Tukey. A diferença estatística entre os parâmetros foi considerada para valores de $p<0,05$.

Resultados

Dados Gerais

As imagens macroscópicas representativas dos fígados dos animais removidos durante o sacrifício estão mostradas na Figura 1. De maneira geral, nos grupos tratados com café/cafeína, especialmente com cafeína 0,1% (G2) e café instantâneo a 2% (G5), observa-se menor quantidade de nódulos hepáticos superficiais (Figura 1).

Em relação ao peso corpóreo, os animais submetidos ao protocolo DEN/CCl_4 e tratados com cafeína 0,2% (G3) apresentaram ganho de peso corpóreo menor em relação aos demais grupos, mas com diferença estatística apenas para os grupos café instantâneo (G5) e café descafeinado (G6). Os animais submetidos ao protocolo DEN/CCl_4 e tratados com cafeína 0,2% (G3) apresentaram menor consumo de ração e líquidos que os demais grupos (dados não mostrados). Baseado no conteúdo de cafeína nas diferentes preparações administradas, o consumo médio estimado de caféina foi de 25 e 35 mg/rato/dia nos grupos cafeína a 0,1% e 0,2% (G2 e G3), respectivamente, e de 21 e 17 mg/kg/rato/dia nos grupos café convencional (G4) e café instantâneo (G5). Em relação as três preparações de café foram detectadas concentrações de cafeína de 1005 e 720 µg/mL no café convencional e instantâneo, respectivamente. Não foi detectada a presença de cafeína na análise do preparado de café descafeinado. A concentração sérica de cafeína nos animais está exposta na tabela 1. Os animais do grupo tratado com cafeína a 0,2% (G2) apresentaram a maior concentração sérica da mesma ($p \leq 0,007$). O grupo tratado com cafeína a 0,1% (G1) apresentou maior concentração da mesma em relação ao grupo tratado com café instantâneo (G5) ($p < 0,01$), e não houve diferença entre os grupos tratados com café convencional (G4) e instantâneo (G5). Não foi encontrada cafeína no soro dos animais pertencentes ao grupo tratado com café descafeinado (G6) (Tabela 1).

Em relação a dosagem de ácido clorogênico, a média de ingestão diária foi de 9, 10 e 6 mg/rato/dia nos grupos café convencional (G4), café instantâneo (G5) e café

descafeinado (G6), respectivamente. As concentrações de ácido clorogênico nos cafés convencional, instantâneo e descafeinado foram de 414, 400 e 284 µg/mL, respectivamente.

Os valores de peso corpóreo final, peso hepático relativo e da dosagem da enzima alanina aminotransferase (ALT) estão indicados na Tabela 1. Ao final do experimento, os animais submetidos ao protocolo DEN/CCl_4 e tratados com cafeína 0,2% (G3) apresentaram peso corpóreo final menor em relação aos grupos G1, G5 e G6. Embora sem diferença estatistica, os animais submetidos ao protocolo DEN/CCl_4 e tratados com cafeína 0,1% (G2), ou café instantaneo (G5) e café descafeinado (G6) apresentaram valores de ALT menores em relação aos demais grupos experimentais.

A análise em HE mostrou que as lesões encontradas com maior freqüência nos animais foram hiperplasia de ductos biliares, esteatose focal, focos de células claras, eosinofílicas e basofílicas e adenomas hepáticos. Não houve diferença na incidência de fibrose classificada como graus I, II e III (dados não mostrados).

Análise de LPN GST-P-positivas, PCNA e apoptose

Os dados das análises morfométricas das LPN e neoplásicas positivas para a enzima glutationa S- transferase, forma placentária (GST-P, Figura 2 A,B), o número de adenomas por cm^2 e o número de núcleos PCNA positivos em fase S (fortemente marcados) contados dentro das lesões estão mostrados na Tabela 2. Em geral, os animais submetidos ao protocolo DEN/CCl_4 e tratados com cafeína 0,1% (G2) ou café instantâneo (G5) apresentaram maior número de lesões GST-P positivas, mas com tamanho médio e porcentagem de área ocupada menores quando comparado com o grupo controle (G1). Em relação à multiplicidade de adenomas hepáticos por cm^2 de área hepática, os grupos cafeína 0,1%, cafeína 0,2% e G2, G5 e G6 apresentaram menores valores quando comparados ao grupo G1 ($p<0,05$) (Tabela 2).

O índice de proliferação celular de hepatócitos PCNA positivos (Figura 2C) em lesões GST-P positivas foi menor no grupo G6 (café descafeinado) em relação a todos os outros grupos experimentais ($p<0,05$). O grupo G2 (cafeína 0,1%) também apresentou menor quantidade de núcleos PCNA positivos em fase S por mm^2 em relação ao grupo G1, porém apenas tendência estatística ($p = 0,054$) (Tabela 2).

O índice de células caspase-3 positivas está na Figura 3. De modo geral o grupo que recebeu café instantâneo apresentou o menor índice de células em apoptose ($p = 0,026$) (figuras 2D, 3).

Quantificação de colágeno

A Figura 4 apresenta os valores de porcentagem de área ocupada por fibras colágenas tipos I e III evidenciadas na coloração de picrossírius (Figuras 4 e 5) nos fígados dos diferentes grupos. O grupo G1 apresentou a maior porcentagem de área ocupada por fibras colágenas dos tipos I e III seguido pelo grupo G5. O grupo que apresentou menor área ocupada por fibras colágenas foi o grupo G6 (Figura 4).

A impregnação com prata pela técnica de Reticulina de Gömori evidenciou as fibras reticulares (colágeno tipo I corado em dourado e colágeno tipo III corado em negro) (Figura 5). De modo geral, as fibras de colágeno tipo I encontram-se presentes ao redor das áreas nodulares, lesões neoplásicas, espaços-porta e veias centrolobulares. Já as fibras de colágeno tipo III, apesar de sua presença nos mesmos locais que as de colágeno tipo I, também foram observadas nos espaços de Disse e no estroma do interior das lesões mistas, principalmente dos colangiomas, mas ausente no interior de adenomas hepáticos.

Quantificação do RNAm dos colágenos I, III e TGF-β1

Em relação à análise molecular pelo PCR em tempo real foram encontradas diferenças quantitativas na expressão gênica do colágeno I nos grupos G2 (cafeína 0,1%), G3 (cafeína 0,2%), G4 (café tradicional) e G6 (café descafeinado) em relação ao controle positivo G1 (Figura 6A). Já em relação à expressão gênica do colágeno III, apenas os grupos G2 e G3 apresentaram menor quantidade do que o grupo controle positivo G1(figura 6B). Nos que diz respeito a expressão gênica do TGF-β não foram encontradas diferenças entre os grupos (Figura 6C).

Expressão de TGF-β1, bax e bcl-2

Os resultados relativos a análise de expressão protéica de TGF-β1, bax, bcl-2 e do controle endógeno β-actina estão indicados na Figura 8. Não houve alteração de expressão protéica do TGF- β1 (Figura 7A) entre os grupos e a marcação imunoistoquímica mostrou que o TGF- β1 foi localizado nas áreas ocupadas por colágeno e no espaço de Disse (Figura 8). Em relação a proteína pró-apoptótica bax, os grupos G2 e G4 apresentaram maior expressão da proteína em relação ao grupo G1 ($p = 0,0051$). Os grupos G5 e G6 apresentaram menor expressão de bax em relação aos grupos G2, G3 e G4, mas não diferiram do controle G1 ($p > 0,05$). O grupo G3 não apresentou diferença significativa de expressão de bax em relação aos grupos G1, G2 e

G4 ($p > 0,05$) (figura 7B). No que diz respeito à expressão da proteína anti-apoptótica bcl-2, os grupos G5 e G6 apresentaram a maior expressão, mas só para o grupo G6 houve diferença estatística em relação aos demais grupos ($p = 0,0017$), exceto do grupo G5. Não foram encontradas diferenças na expressão protéica de bcl-2 entre os grupos G1, G2, G3, G4 e G5 ($p > 0,05$) (Figura 7C).

Discussão

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do café ou da cafeína isolada sobre o processo de fibrose e de promoção/progressão da hepatocarcinogênese química induzida pelo tratamento com DEN/CCl_4 em ratos Wistar. É bem documentado que o consumo de café ou cafeína diminuem os níveis séricos de ALT [17,38]. Entretanto, Modi e colaboradores (2010) reportaram impacto do consumo de cafeína no processo fibrótico mas não nos níveis de ALT[39]. Em nosso estudo observamos níveis séricos de ALT menores nos grupos tratados com cafeína a 0,1% (G2), café convencional (G4), café instantâneo (G5) e café descafeinado (G6) em relação ao controle positivo (G1) e ao grupo cafeína a 0,2% (G3), porém sem significância estatística, o que demonstra a tendência do café/cafeína a 0,1% na recuperação das lesões hepáticas induzidas pelo CCl_4. Nossos achados contrariam Ruhl e Everhart (2005) que demonstraram que o consumo de alta concentração de cafeína está associado a diminuição dos níveis de ALT, visto o grupo tratado com caféina a 0,2% apresentou os maiores níveis séricos de ALT[40].

A fibrose hepática é iniciada por uma cascata de eventos resultantes de danos hepáticos, recrutamento de células inflamatórias para o fígado injuriado e ativação de células produtoras de colágeno[5,6]. Estudos indicam que as células hepáticas estreladas (CHE) quiescentes, que armazenam gordura e vitamina A, são ativadas para miofibroblastos, perdem esses retinóides e começam a expressar novos receptores como para o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento e transformação beta 1 (TGF-β1), e novas proteínas como a alfa-actina de músculo liso. A proliferação de CHE ativadas e a síntese de proteínas da MEC produzem a cicatriz fibrosa encontrada nas doenças crônicas do fígado[41,42]. Embora o TGF-β1 seja relacionado ao desenvolvimento da fibrose hepática[43], nos achados deste estudo não foi observada diferença de expressão gênica e protéica desta citocina entre os grupos experimentais. Este achado pode ser devido ao período em que foram coletados os

fígados, visto que os animais receberam a última aplicação de CCl_4 duas semanas antes de serem eutanasiados. Neste período pode se ter perdido o pico de ação desta citocina visto que não houve estímulo externo para a deposição de mais colágeno e, consequente avanço da fibrose/cirrose, que já se encontrava instaurada. Além disso, provavelmente por este mesmo motivo, não encontramos evidências de que a expressão do TGF-β1 seja modulada pelo café ou pela cafeína contrariando aos resultados de Shin e colaboradores (2010)[19]. Como a fibrose já se encontrava em grau avançado, mesmo sem o pico de ação do TGF-β1 no momento da eutanásia, uma grande quantidade de fibras colágenas tipos I e III estavam depositadas no fígado dos animais do grupo controle (G1), mas nos grupos de animais que receberam tratamento com café (convencional ou descafeinado) ou cafeína (G2, G3, G4 e G6) foi observado uma diminuição significativa nas frações de áreas ocupadas pelos colágenos quando comparado ao grupo que recebeu somente água (G1). Provavelmente, ao longo das primeiras 23 semanas de tratamento DEN/CCl_4 houve diminuição da expressão de TGF- β1 nos grupos tratados com café (convencional ou descafeinado) ou cafeína, o que pode ter contribuído para a menor deposição de colágenos I e III no fígado dos animais pertencentes a estes grupos. Os animais dos grupos tratados com cafeína, café convencional e café descafeinado apresentaram menor expressão do RNAm do colágeno I (principal componente da cicatriz fibrótica) e menor porcentagem de fibras colágenas (I e III) visualizadas pela técnica do picrossírius. Em adição, somente os animais tratados com cafeína (0,1% e 0,2%) apresentaram redução na expressão do RNAm para o colágeno III, mas sem resposta dose-dependente. Além disso, a quantidade de cafeína nas soluções de café e cafeína e no soro dos animais parece não ter sido determinante na proteção contra o desenvolvimento da fibrose hepática, visto que o tratamento com café descafeinado levou a uma redução significativa na quantidade de fibras colágenas do parênquima hepático e os efeitos da cafeína sobre a fibrose não foi dose-dependente. Esses dados comprovam que a cafeína pura, a associação entre a cafeína e os outros componentes do café convencional e os componentes do café descafeinado apresentam eficácia na prevenção da evolução do processo fibrótico no fígado de ratos Wistar. Esses achados deste são concordantes com diversos estudos experimentais e epidemiológicos que associam a ingestão de cafeína e de outros componentes do café a prevenção de doenças hepáticas[10,27,39,44,45].

Os resultados deste estudo também indicam que os tratamentos com café cafeína 0,1 % e café instantâneo apresentam efeitos benéficos na redução do desenvolvimento

de LPN GST-P positivas em ratos Wistar submetidos ao modelo DEN/CCl_4. Relatos recentes mostram que o café instântaneo reduz a fibrose induzida pelo CCl_4 em ratos machos da linhagem Sprague-Dawley[17,18]. Em nosso estudo não encontramos efeitos anti-fibróticos evidentes (diminuição da área ocupada por colágenos I e III) do café instantâneo em ratos Wistar submetidos ao modelo DEN/CCl_4. Nos grupos tratados com café instantâneo (G5) e cafeína 0,1% (G2) os animais apresentaram maior quantidade de LPN pequenas (0,01 a 1 μm) em relação ao controle positivo (G1), o que resultou em menor porcentagem de área ocupada por estas lesões. Além disso, estes grupos e o grupo tratado com café descafeinado (G6) apresentaram redução da multiplicidade de adenomas por cm^2. O grupo tratado com cafeína 0,1% (G2) e com café descafeinado (G6) também apresentaram menor índice de proliferação celular em relação aos demais grupos. Portanto, a cafeína parece ter um papel preventivo sobre o processo de hepatocarcinogênese química, tanto isolada como em conjunto com os demais componentes do café instantâneo. Em contrapartida, mesmo na ausência de caféina os outros componentes do café descafeinado comuns ao do café convencional também parecem ter ação sobre o processo de proliferação celular. Da mesma forma, o aumento da ingestão de cafeína pelo grupo cafeína 0,2%, comparado com os demais grupos, parece não contribuir para a redução de LPNs e da taxa de proliferação celular.

O café instantâneo, além da cafeína, apresenta grande quantidade de diterpenos (cafestol e kaweol), que tem a capacidade de alterar a expressão e a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos[46-49]. A inibição de enzimas de fase I e a hiper-expressão de enzimas de fase II, como as GSTs, parecem reduzir o acúmulo de metabólitos tóxicos dentro dos hepatócitos[47]. Lee e colaboradores (2007) relataram que o pré-tratamento com cafestol e kaweol em camundongos submetidos ao modelo do CCl_4 diminuiu a hepatotoxicidade por inibir o citocromo CYP2E1, que é a enzima responsável pela bioativação do CCl_4[20]. Além disso, pesquisas mostram que o cafestol e o kaweol, avaliados em modelos *in vivo* e *in vitro*, reduzem a toxicidade de diversos cancerígenos, por induzir a atividade de enzimas de fase II, aumentando os níveis hepáticos de GSTs e diminuindo os adutos de DNA gerados pelos cancerígenos químicos[50,52].

Os grupos tratados com a caféina isolada ou café convencional apresentaram maior expressão da proteína anti-apoptotica bax em relação ao grupo controle positivo G1. Por outrolado, o grupo G6 (café descafeinado) apresentou a maior expressão da proteína pró-anti-apoptótica bcl-2, inferindo que, provavelmente, a cafeína possa

interferir no processo apoptótico, embora não tenhamos encontrado diferenças nos índices de caspase-3 clivada nestes grupos. Não foram encontradas diferenças nas expressões de bax e bcl-2 no grupo G5 (café instantâneo) em relação a G1 (controle positivo), talvez devido a concentração do preparado (2%, sendo 17 mg de cafeína/rato/dia), visto que Shi e colaboradores (2010) relataram que ratos SD tratados com CCl_4 que receberam café instantâneo (300 mg/Kg) apresentaram redução da expressão gênica e protéica de bcl-2 e aumento de bax[18].

De modo geral podemos concluir que o café convencional apresenta os melhores efeitos na redução do processo fibrótico. Da mesma forma, o consumo de café instantâneo parece contribuir contra o avanço da hepatocarcinogênese química em ratos Wistar por diminuir a área ocupada por lesões pré-neoplásicas, mas não altera a deposição de colágeno no fígado. Em contrapartida, o consumo de cafeína pura, em especial a 0,1%, e de café descafeinado parece contribuir tanto para prevenção do HCC como na redução do processo fibrótico, sendo a cafeína isolada tão eficaz quanto os outros componentes do café associados. Novas pesquisas sobre a constituição química diferencial das amostras de café utilizadas neste estudo parecem ser fundamentais na interpretação dos resultados deste estudo.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela FAPESP (07/54858-5; 08/50985-5) e CNPq. (474572/2008-0; 301585/2009-1).

Referências

1. Anselmi K. Subbotin VM. Nemoto E. Gandhi CR. Accelerated reversal of carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats by the endothelin receptor antagonist TAK-044. J Gastroenterol Hepatol. 2002; 17:589-97.
2. Saile B. Ramadori G. Inflammation, damage repair and liver fibrosis-role of cytokines and different cell types. Z Gastroenterol. 2007; 45: 77-86.
3. Severi T. Van-Malenstein H. Verlype C. Van-Pelt JF. Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets. Acta Pharmacol Sin. 2010 ;31(11):1409-20.
4. Guitiérrez-Ruiz, MC. Gómez-Quiroz LE. Liver fibrosis: searching for cell model answers. Liver International. 2007: 1478-3223.
5. Wanless IR., Pathogenesis of cirrhosis. J Gastroenterol Hepatol. 2004; 19: S369-71.
6. Fallowfield JA. Kendall TJ. Iredale JP., Reversal of fibrosis: No longer a pipe dream? Clin Liver Dis. 2006; 10:481-97.
7. Arthur MJP. Fibrogenesis: metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. Am J Physiol Gastrointest Liver Phisiol. 2000;279:245-9.
8. Motola-Kuba D, Zamora-Valdés D, Uribe M, Mendes-Sánchez N. Hepatocellular carcinoma. An overview. Ann Hepatol. 2006;5:16-24.
9. El-Serag HB. Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. Gastroenterol. 2007;132:2557-76.
10. Costentin, C.E., Roudot-Thoraval, F., Zafrani, E-S., Medkour, F., Pawlotsky, J-M., Mallat, A., Hézode, C., Association Of Caffeine Intake and Histological Features of Chronic Hepatitis C, Journal of Hepatology (2010), in press.
11. Leung WW. Ho SC. Chan HL. Wong V. Yeo W. Mok TS. Moderate coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B chronic carriers: a case-control study. J Epidemiol Community Health. 2010 [Epub ahead of print].
12. Corrao G. Zambon A. Bagnardi V. D'Amicis A. Klatsky A. Coffee, Caffeine, and the Risk of Liver Cirrhosis. AEP 2001; 11(7): 458-465.
13. Klatsky AL. Armstrong MA. Alcohol, smoking, coffee, and cirrhosis. Am J Epidemiol. 1992; 136 (10):1248-1257.

14. Misík M. Hoelzla C. Wagnerb CH. Cavin C. Mosera B. Kundi M. Impact of paper filtered coffee on oxidative DNAdamage: Results of a clinical trial. Mutation Research. 2010; 692: 42–48
15. Muriel P. Arauz J. Coffee and liver diseases. Fitoterapia. 2010; 81:297–305.
16. Klatsky AL., Morton C., Udaltsova N., et al. Coffee, cirrhosis, and transaminase enzymes. Arch Intern Med. 2006; 166: 1190-5
17. Ozercan IH. Dagli AF. Ustundag B. Ozercan MR. Bahcecioglu IH. Çelik H. et al. Does instant coffee prevent acute liver injury induced by carbon tetrachoride (CCl4)? Hepatol Res. 2006;35:163-8.
18. Shi H, Dong L, Zhang Y, Bai Y, Zhao J, Zhang L. Protective effect of a coffee preparation (Nescafe pure) against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. Clin Nutr. 2010; 29(3):399-405.
19. Shin JW. Wang JH. Kangb JK. Sona CG. Experimental evidence for the protective effects of coffee against liver fibrosis in SD rats. J Sci Food Agric. 2010; 90: 450–5.
20. Lee KJ, Choi JH, Jeong HG. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. Food Chem Toxicol 2007;45:2118-2125.
21. Poyrazoglu OK. Bahcecioglu IH Ataseven H. Metin K. Dagli AF. Yalniz MY. Ustundag B. Effect of Unfiltered Coffee on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Rats. Inflammation. 2008; 31 (6): 408-13.
22. Hasegawa R. Ogiso T. Imaida K. Shirai T. Ito N. Analysis of the potential carcinogenicity of coffee and its related compounds in a médium-term liver bioassay of rats. Fd Chem Toxic. 1995;33:15-20.
23. Morii H. Kuboyama A Nakashima T. Kawai K. Kasai H. Tamae K. et al. Effects of Instant Coffee Consumption on Oxidative DNA Damage, DNA Repair, and Redox System in Mouse Liver. J Food Sci. 2009; 74: H155-61.
24. Silva-Oliveira, Eliane M. , Fernandes, Paula A. andMoraes-Santos, Tasso. 'Effect of Coffee on Chemical Hepatocarcinogenesis in Rats', Nutrition and Cancer. 2010; 62 (3): 336 – 42.
25. Hasegawa R, Ito N. Liver cancer-term bioassay in rats for screening of carcinogens and modifying factors in hepatocarcinogenesis. Food Chem Toxicol. 1992;30:979-92.

26. Iwai S. Karim R. Kitano M. Sukata T. Min W. Morimura K. et al. Role of oxidative DNA damage caused by carbon tetrachloride-induced liver injury – enhancement of MeIQ0induced glutathione S-transferase placental form-positive foci in rats. Cancer Letters. 2002;179:15-24.

27. Hosaka S. Kawa S. Aoki Y. Tanaka E. Yoshizawa K. Karasawa Y. et al. Hepatocarcinogenesis inhibition by caffeine in ACI rats treated with 2-acetylaminofluorene. Food and Chem. Toxicol. 2001; 39: 557-561.

28. Bannasch P. Enzmann H. Klimek F. Weber E. Zerban H. Significance of sequential cellular changes inside and outside foci altered hepatocytes during hepatocarcinogenesis. Toxicol Pathol. 1989; 17: 617-29.

29. Bannasch P, Zerban H. Predictive value of hepatic preneoplastic lesions as indicators of carcinogenic response. In: Vainio H, Magee PN, McGregor DB, McMichal AJ, editors. Mechanism of Carcinogenesis in Risk Indetification. Lyon: IARC Sci Publ. 1992; 116: 389- 427.

30. Silva JF. Bidinotto LT. Furtado KS. Salvadori DM. Rivelli DP. Barros SB. et al. Maté attenuates DNA damage and carcinogenesis induced by diethylnitrosamine and thermal injury in rat esophagus. Food Chem Toxicol. 2009; 47(7):1521-9.

31. Paroni R. De Vecchi E. Cighetti G. Et al. HPLC with o-phtalaldeyde precolumm derivatization to mesure total, oxided, and protein-bound glutathione in blood, plasma, and tissue. Clinical Chemistry, Washington, v. 41, n.3, p. 448-454, 1995.

32. Pinheiro F, Faria RR, de Camargo JL, Spinardi-Barbisan AL, da Eira EF, Barbisan LF. Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom Agaricus blazei Murrill in the rat. Food Chem. Toxicol. 2003; 41(11): 1543-50.

33. Bruck R. Weiss S.Traister A. Zvibel I. Aeed H. Halpern Z. Oren R. Induced hypothyroidism accelerates the regression of liver fibrosis in rats. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2007; 22: 2189–94.

34. Bustin SA. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009; 55:611-22.

35. Lefever, S. et al. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. Nucleic Acids Res. 2009;3:, 2065-9.

36. Livak KJ. Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods; 2001; 25: 402-8.

37. Zeng ZS. Cohen AM. Guillem JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. Carcinogenesis 1999; 20:749-55.

38. Cadden, I.S.; Partovi, N.; Yoshida, E.M. Review article: possible beneficial effects of coffee on liver disease and function.Aliment Pharmacol. Ther. 2007; 26 (1):1-8.

39. Modi AA. Feld JJ. Park Y. Kleiner DE. Everhart JE. Liang TJ. Hoofnagle JH. Increased Caffeine Consumption Is Associated with Reduced Hepatic Fibrosis. Hepatology. 2010; 51:201-9.

40. Ruhl CE, Everhart JE. Coffee and caffeine consumption reduce the risk of elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. Gastroenterology 2005, 128: 24-32.

41. Geerts, A. History, heterogeneity, developmental biology and functions of quiescent hepatic stellate cells. Semin. Liver Dis. 2001; 31 (3): 311-35.

42. Brenner DA. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. Transactions of the American Clinical and Climatological Association. 2009;120:361-7.

43. Li JT. Liao ZX. Ping J. Xu D. Wang H. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifi brotic therapeutic strategies. J Gastroenterol 2008; 43:419–28.

44. Kurozawa Y, Ogimoto I, Shibata A, Nose T, Yoshimura T, Suzuki H, et al. Coffee and risk of death from hepatocellular carcinoma in a large cohort study in Japan. Br J Cancer 2005;93:607-610.

45. Shimazu T., Tsubono Y., Ohmori K., Koizumi Y., Nishino Y., Shibuya D., Tsuji I . Coffee consumption and the risk of primary liver cancer: pooled analysis of two prospective studies in japan. Int J Cancer, 2005; 116(1): 150-4.

46. Majer BJ. Hofer E. Cavin C. Lhoste E. Uhl M. Glatt HR. Coffee diterpenes prevent the genotoxic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and Nnitrosodimethylamine in a human derived liver cell line (HepG2). Food Chem Toxicol 2005;43:433-41.

47. Cavin C. Marin-Kuan M. Langouet S. Bezencon C. Guignard G. Verguet C. Induction of Nrf2-mediated cellular defenses and alteration of phase I activities as mechanisms of chemoprotective effects of coffee in the liver. Food Chem Toxicol 2008;46:1239-48.

48. Higgins LG. Cavin C. Itoh K. Yamamoto M. Hayes JD. Induction of cancer chemopreventive enzymes by coffee is mediated by transcription factor Nrf2: evidence that the coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol confer protection against acrolein. Toxicol Appl Pharmacol 2008; 226:328-37.

49. Huber WW. Rossmanith W. Grusch M. Haslinger E. Prustomersky S. et al. Effects of coffee and its chemopreventive components kahweol and cafestol on cytochrome P450 and sulfotransferase in rat liver. Food Chem Toxicol 2008;46:1230-38.

50. Cavin C, Holzhaeuser D, Scharf G, Constable A, Huber WW, Shilter B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. Food Chem Toxicol 2002; 40: 1155–63.

51. Huber WW. Prustomersky S. Delbanco E. et al. Enhancement of the chemoprotective enzymes glucuronosyl transferase and glutathione transferase in specific organs of the rat by coffee components kahweol and cafestol. Arch Toxicol 2002; 76: 209–17.

52. Huber WW. Scharf G. Rossmanith W. et al. The coffee components kahweol and cafestol induce gamma-glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of chemoprotective glutathione synthesis, in several organs of the rat. Arch Toxicol 2002; 75: 685–94.

Tabela 1 - Valores de peso corpóreo final (g), peso hepático relativo (%), concentração sérica da enzima alanina aminotransferase (ALT, U/L) e de cafeína (µg/mL) dos grupos experimentais ao final da semana 25[1].

Grupos/tratamentos[2]	Peso corpóreo final (g)	Peso hepático relativo (g/100g de p.c.)	ALT (U/L)	Concentração sérica de cafeína (µg/mL)
G1 (controle +)	385,28 ± 45,54[c]	3,67 ± 0,29	100 ± 42,75	0
G2 (cafeína 0,1%)	382,92 ± 30,19	3,39 ± 0,62	70,38 ± 22,66[b]	11,63 ± 3,36[c]
G3 (cafeína 0,2%)	348,46 ± 27,85[a]	3,89 ± 0,56	113,33 ± 38,22	28,78 ± 9,89 [b,e]
G4 (café convencional)	370,86 ± 43,55	4,00 ± 1,03	85,38 ± 32,43	8,80 ± 2,68[c]
G5 (café instant.)	397,07 ± 31,46[b]	3,51 ± 0,52	72,46 ± 17,96[b]	7,32 ± 2,45 [b,c]
G6 (café descaf.)	397,63 ±26,16[b]	3,66 ± 0,45	75,88 ± 27,26	0

[1]Valores expressos como média ± DP; [2] Ver delineamento experimental; [a,b,c,d,e,f] Diferença em relação aos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6 respectivamente, $p < 0,05$.

Tabela 2: Lesões hepáticas pré e neoplásicas GST-P positivas, número médio de adenomas por cm^2 e número de núcleos PCNA positivos em fase S por mm^2 dos grupos experimentais ao final da semana 25[1].

Grupos/tratamentos[2]	Nº de núcleos PCNA$^+$ / mm^2	Lesões hepáticas GST-P positivas			
		Nº lesões/cm^2	Área média (mm^2)	% área hepática	Nº adenomas/cm^2
G1 (controle +)	0,042 ± 0,018[f]	33,42 ± 7,11	1,60 ± 0,28	53,49 ± 14,14	6,81 ± 4,18
G2 (cafeína 0,1%)	0,027 ± 0,014[§]	52,15 ± 11,96[a]	0,62 ± 0,33[a]	30,11 ± 11,69[a]	1,48 ± 1,25[a]
G3 (cafeína 0,2%)	0,041 ± 0,02[b,f]	47,26 ± 10,46	0,98 ± 0,62	41,81 ± 19,33	4,09 ± 3,09[b]
G4 café tradicional	0,038 ± 0,02[f]	45,98 ± 13,48	0,93 ± 0,51[a]	38,91 ± 19,65	4,97 ± 4,59
G5 café instant.	0,038 ± 0,022[f]	51,97 ± 16,51[a]	0,69 ± 0,47[a]	30,62 ± 15,00[a]	2,91 ± 2,35[a]
G6 café descaf.	0,021 ± 0,011[a]	44,04 ± 8,51	1,01 ± 0,55	41,78 ± 18,08	2,39 ± 1,57[a]

[1] Valores expressos como média ± DP; [2] Ver delineamento experimental; [a, b, f] Diferença em relação aos grupos G1, G2 e G6 respectivamente, $p<0,05$; § tendência a significância G1>G2 $p = 0,054$.

Legenda das Figuras

Figura 1: Amostra representativa do fígado retirado dos animais após as 25 semanas de experimento. A e B – G1 (controle); C e D – G2 e G3 (cafeína 0,1% e 0,2%); E – G4 (café tradicional); F – G5 (café instantâneo); G – G6 (café descafeinado).

⬆ Lesão Neoplásica

▲ Lesões pré-neoplásicas

Figura 2: Cortes histológicos de fígados com marcação imunoistoquímica para: GST-P - A – adenoma; B – Lesão Pré-neoplásica; PCNA - C – núcleo PCNA positivo em fase S (seta); Caspase-3 clivada - D - célula em apoptose (seta).

Figura 3: Índice apoptótico, obtido pela contagem de células caspase-3 positivas, nos grupos experimentais. ^{b,c,d,e} Diferença em relação a G2, G3, G4 e G5 respectivamente , p=0,026

Figura 4: Porcentagem média de área ocupada por fibras colágenas tipos I e III nos grupos experimentais. ^{a,b,c,d,e,f} Diferença em relação aos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6 respectivamente, $p<0,05$.

Figura 5: Cortes histológicos de fígado corados por picrossírius (A,C,E) e pela técnica de reticulina de Gömori (B,D,F) evidenciando em dourado as fibras de colágeno tipo I e em negro de colágeno tipo III. A e B – fibrose grau I; C e D – fibrose grau II; E e F – fibrose grau III

Figura 6: Variação da expressão gênica do colágeno I (A), colágeno III (B) e TGF-β1 (C) em relação ao calibrador externo (valor estipulado em 1). a,b,c,d,e,f Diferenças em relação a G1, G2, G3, G4, G5 e G6, respectivamente; $p<0,001$.

Figura 7: Variação da expressão protéica e membrana representativa de (A) TGF-β1, (B) bax e (C) bcl-2 nos grupos experimentais em relação ao calibrador G1 com valor fixado em 1 (G1 = 1). a,b,c,d,e,f Diferença em relação a G1, G2, G3, G4, G5 e G6, respecivamente.

Figura 8: Fragmentos hepáticos marcados por imunoistoquímica para TGF-β1. Notar marcações no espaço de Disse (A) e nas áreas ocupadas por colágenos tipos I e III (B).

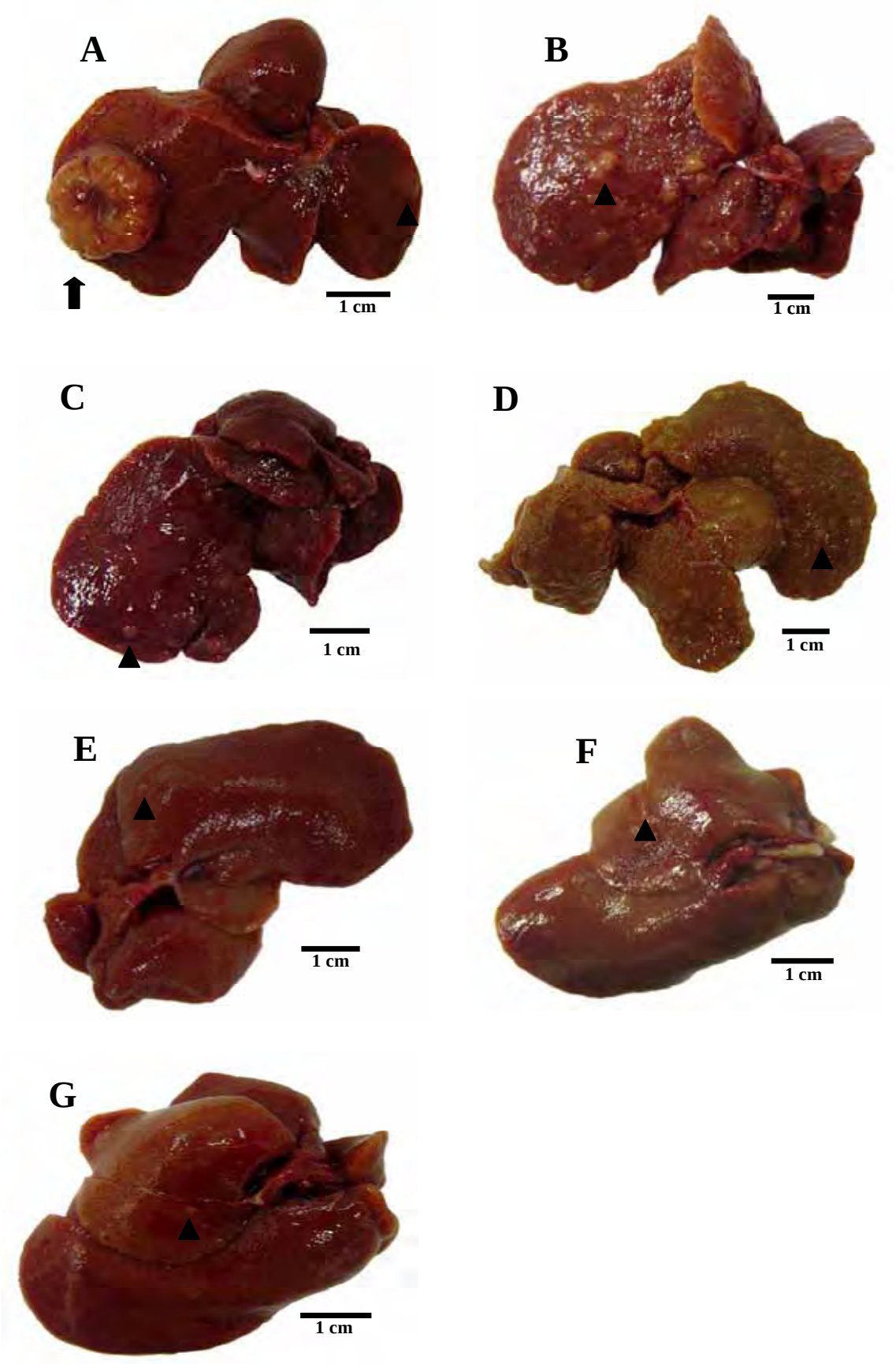


Figura 1

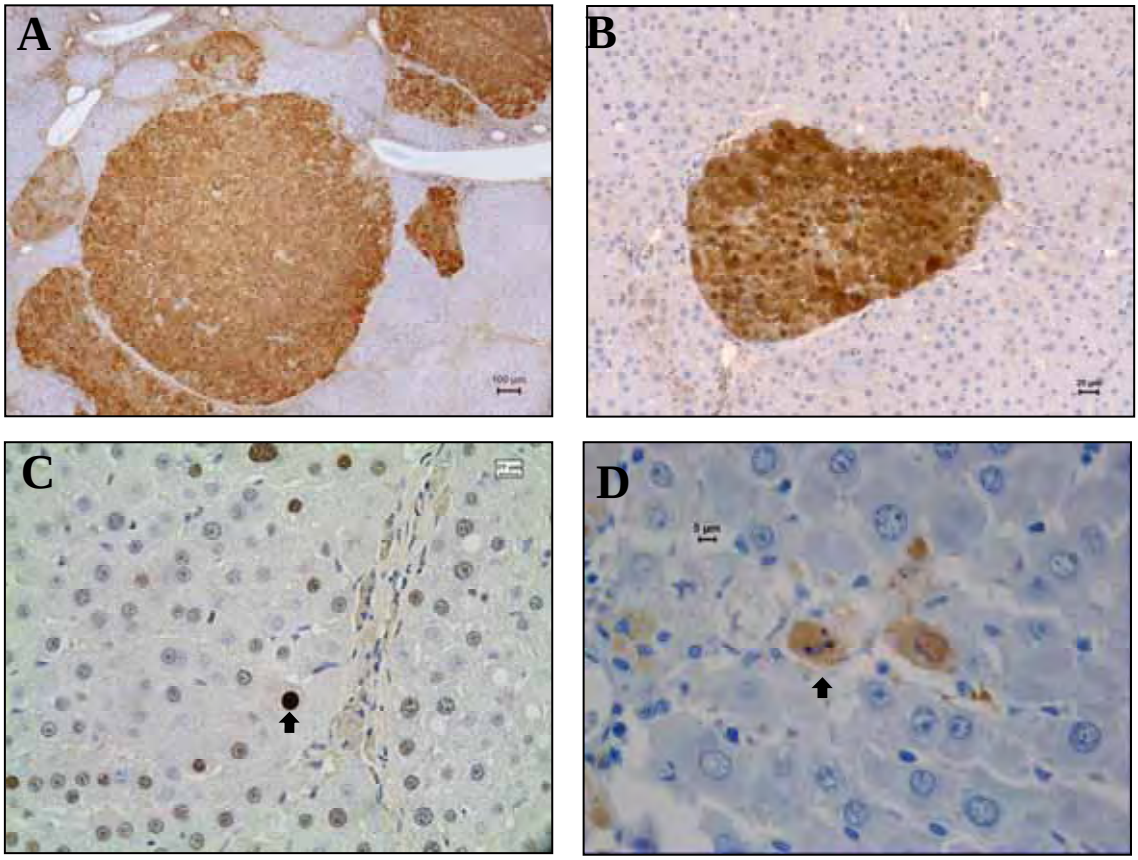


Figura 2

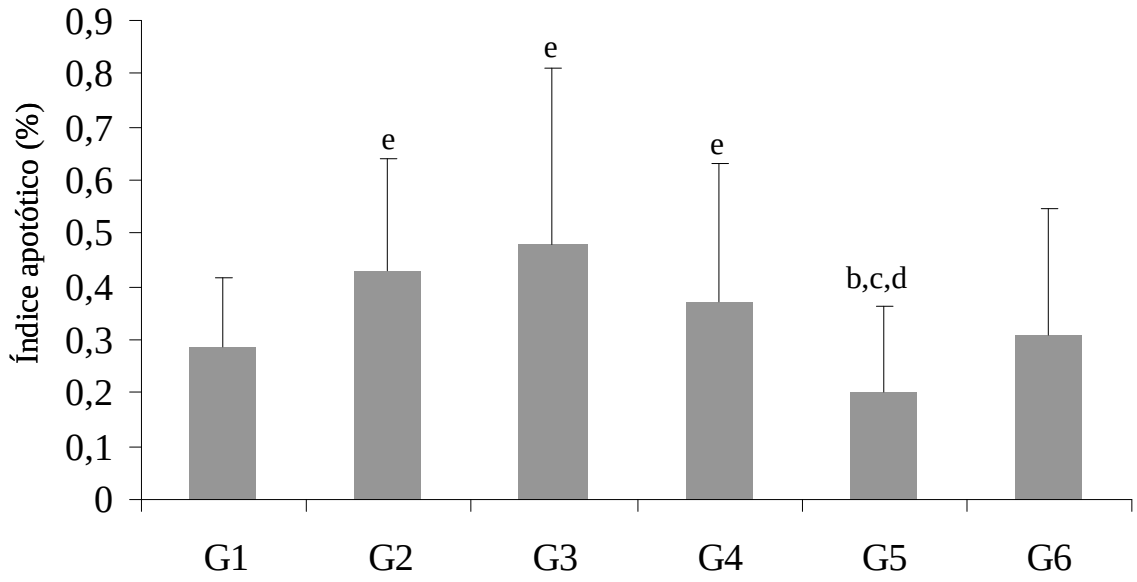

Índice apotótico (%)
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
e
e
e
b,c,d
G1
G2
G3
G4
G5
G6

Figura 3

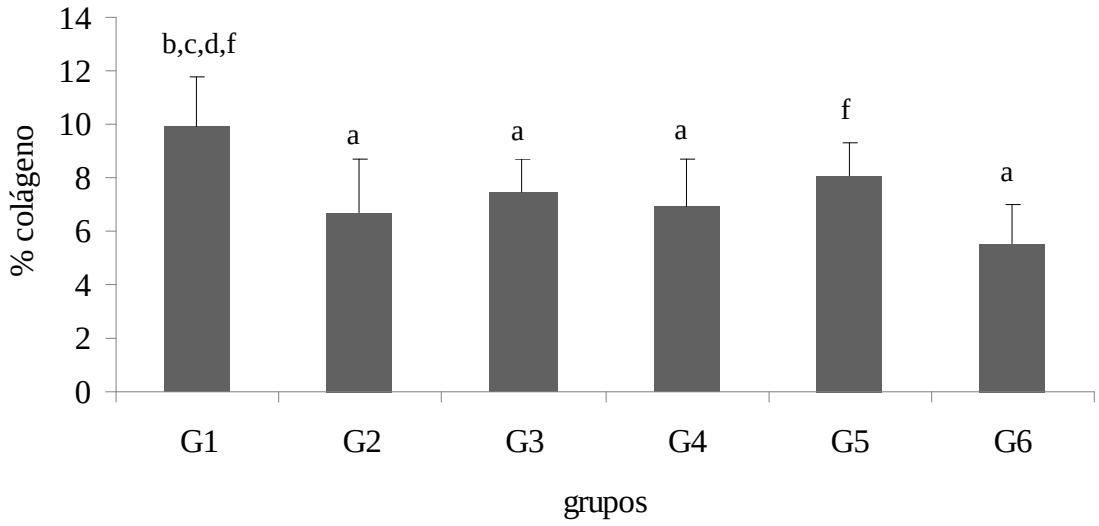


Figura 4

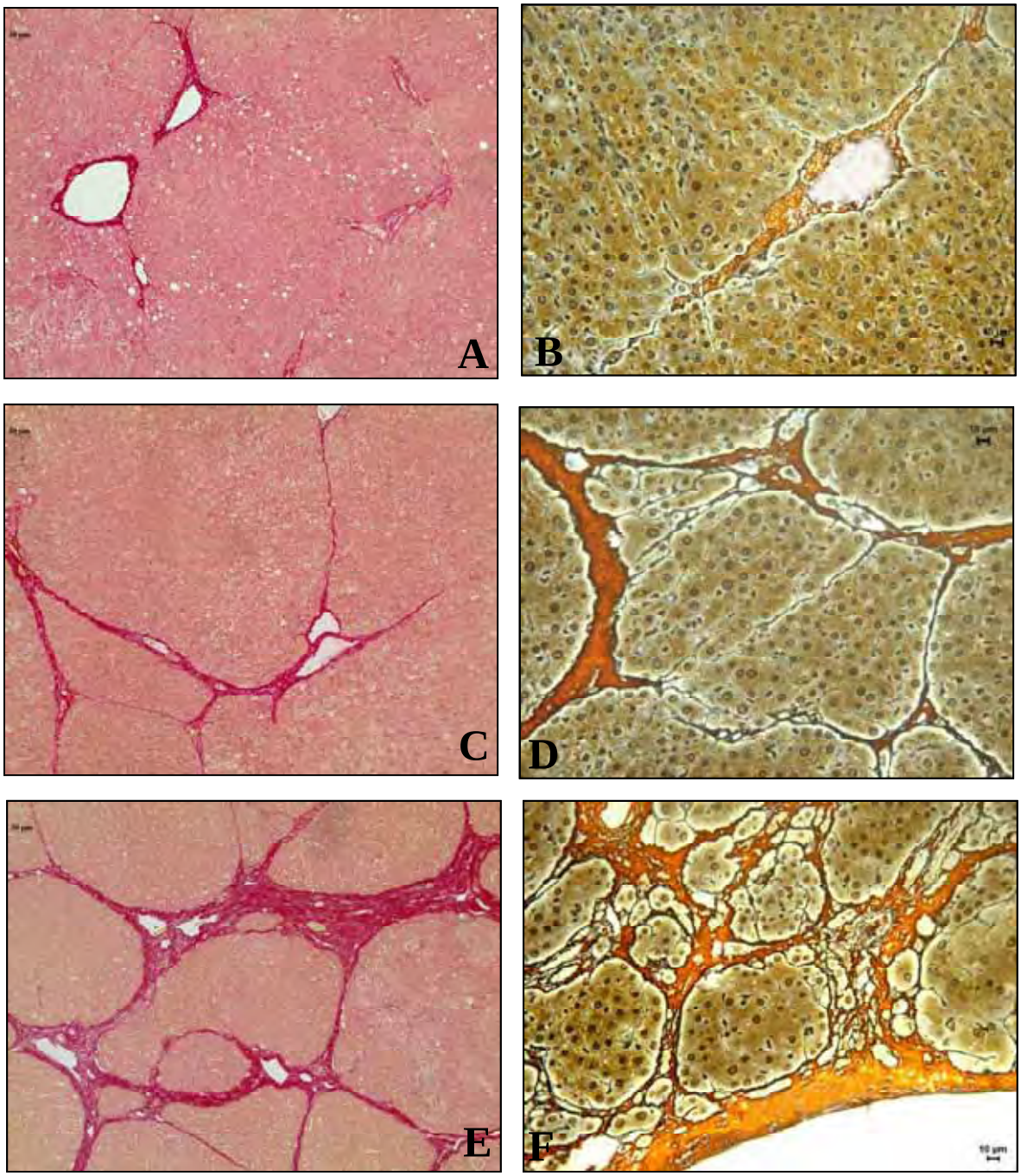


Figura 5

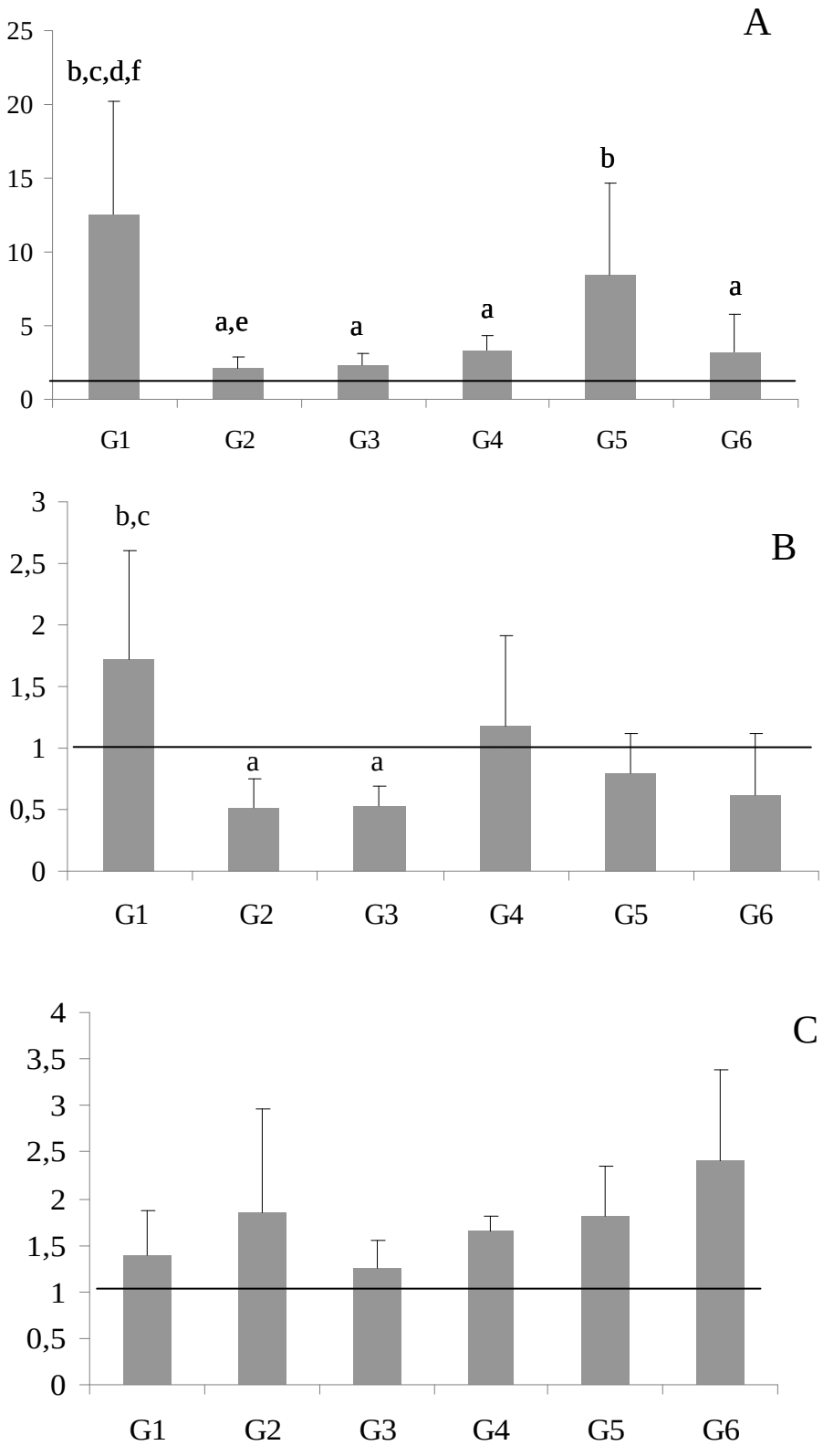

A
25
20
15
10
5
0
b,c,d,f
a,e
a
a
b
a
G1
G2
G3
G4
G5
G6
B
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
b,c
a
a
G1
G2
G3
G4
G5
G6
C
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
G1
G2
G3
G4
G5
G6

Figura 6

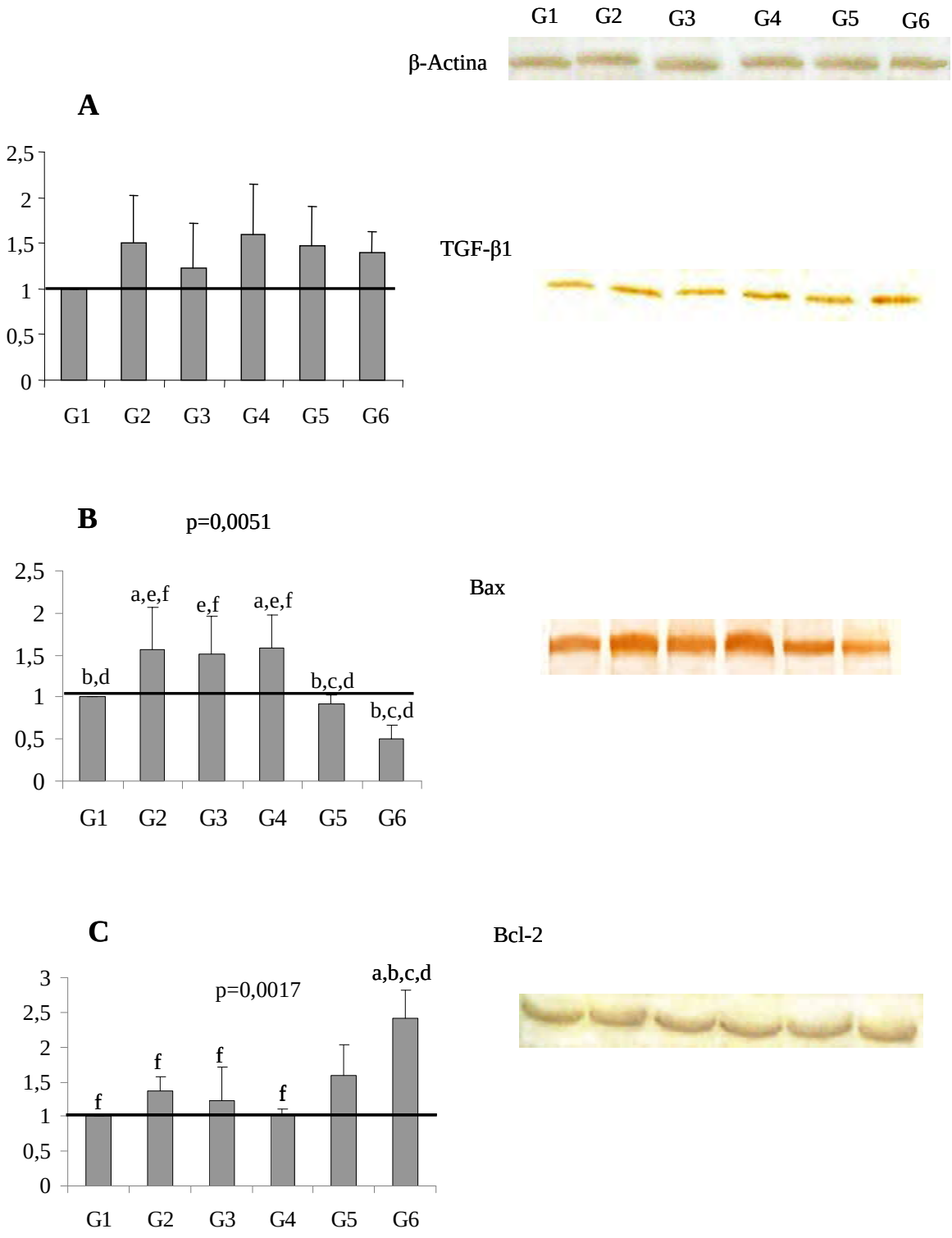

G1 G2 G3 G4 G5 G6
β-Actina
A
2,5
2
1,5
1
0,5
0
G1 G2 G3 G4 G5 G6
TGF-β1
B
p=0,0051
a,e,f
e,f
a,e,f
b,d
b,c,d
b,c,d
Bax
C
p=0,0017
a,b,c,d
f
f
f
f
Bcl-2

Figura 7

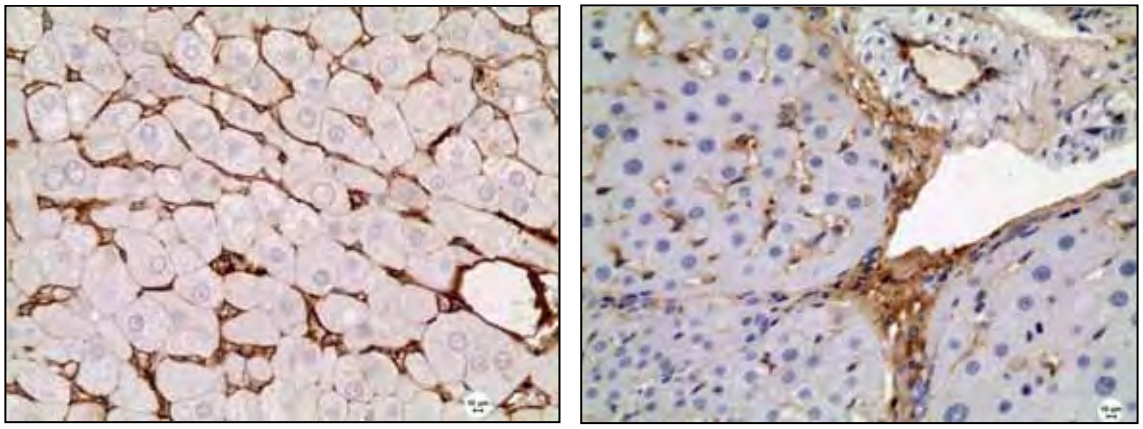


Figura 8

Conclusões Finais

1 - Os tratamentos com café convencional e descafeinado e com a cafeína reduziram a fibrose hepática, mostrando que tanto a cafeína isolada quanto os outros componentes do café são capazes de modular o processo fibrótico e a hepatotoxicidade induzidos pelo CCl_4 a TAA, respectivamente, no fígado de ratos Wistar machos.

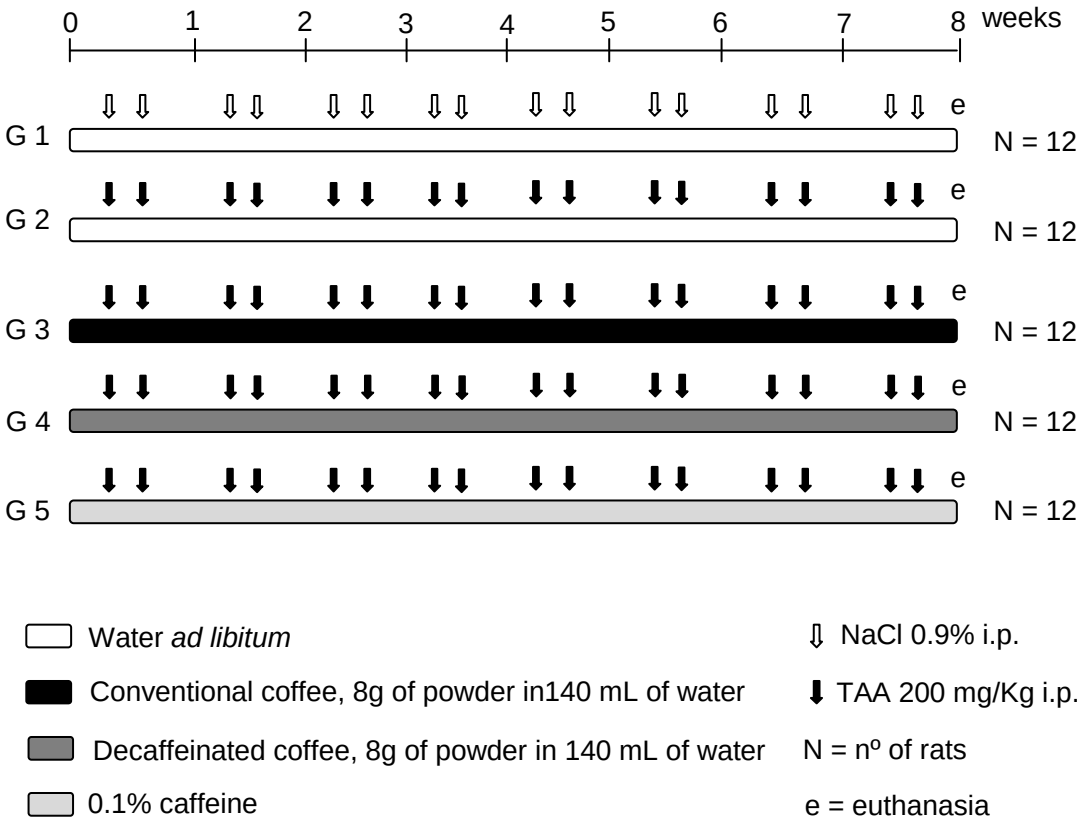
2 – O café instantâneo, a cafeína a 0,1% e o café descafeinado são capazes de proteger contra a evolução da hepatocarcinogênese química em ratos Wistar machos tratados com CCl_4.

3 – O café instantâneo não apresentou efeito sobre o processo fibrótico induzido pelo CCl_4 no fígado de ratos Wistar machos.

4 – São necessários mais estudos dos componentes do café e de outras concentrações mais baixas de cafeína para que o mecanismo de ação da cafeína e dos outros constituintes do café sejam melhor elucidados.

Anexos

Anexo 1



Experimental Design (article 1)

Anexo 2: Initial and final body weight (g), body weight reduction (%) and mean liquid (mL/rat/day) and food (g/rat/day) intake of the rats of the experimental groups[1] (article 1).

Groups/Treatments[2]	Number of rats	Initial Body Weight (g)	Final Body Weight (g)	Reduction (%)	Liquid Intake (mL/rat/day)	Food Intake (g/rat/day)
G1 (- control)	10	388.92 ± 27.25	438.00 ± 37.10	0	26.34 ± 2.53	21.44 ± 2.17
G2 (+ control)	11	387.42 ± 32.46	359.08 ± 35.84[a]	28.3[a]	20.22 ± 6.47[a]	15.81 ± 4.54[a]
G3 (trad. coffee)	10	392.67 ± 24.67	361.67 ± 37.99 [a]	31.0[a]	19.38 ± 7.79 [a]	15.08 ± 5.92[a]
G4 (decaf. coffee)	12	391.50 ± 23.36	367.67 ± 20.72 [a]	23.8[a]	19.21 ± 7.87[a]	15.59 ± 5.84[a]
G5 (0.1% caffeine)	11	391.50 ± 25.51	365.42 ± 39.78[a]	26.1[a]	16.79 ± 5.54[a]	15.77 ± 5.09[a]

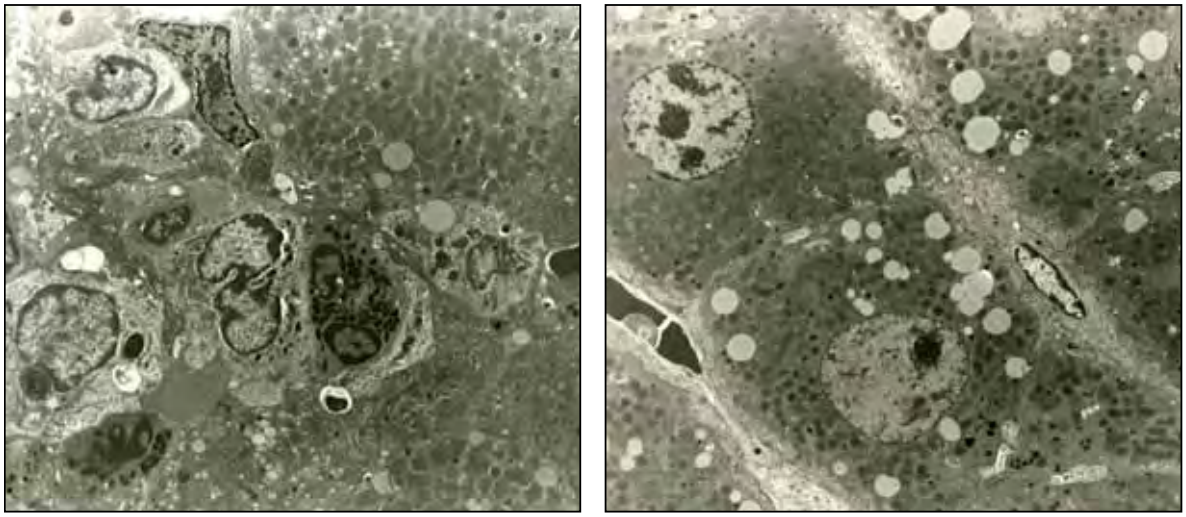
[1] Values are mean ± SD; [2] See experimental design; [a] Different from G1; $p < 0.001$.

Anexo 3: Analysis of GST-P 7-7 positive lesions in liver of the different experimental groups at the end of week 8[1] (article 1).

Groups[2]	N° of rats	GST-P 7-7 positive lesions		
		Mean size (mm^2)	Foci number/cm^2	% Liver area
G1	12	0	0	0
G2	12	0.388 ± 0.192[a]	3.537 ± 1.750[a]	0.158 ± 0.101[a]
G3	12	0.309 ± 0.078[a]	1.977 ± 1.133[§]	0.155 ± 0.047[a]
G4	12	0.328 ± 0.172[a]	2.349 ± 1.458[a]	0.160 ± 0.094[a]
G5	12	0.288 ± 0.105[a]	2.491 ± 1.092[a]	0.119 ± 0.045[a]

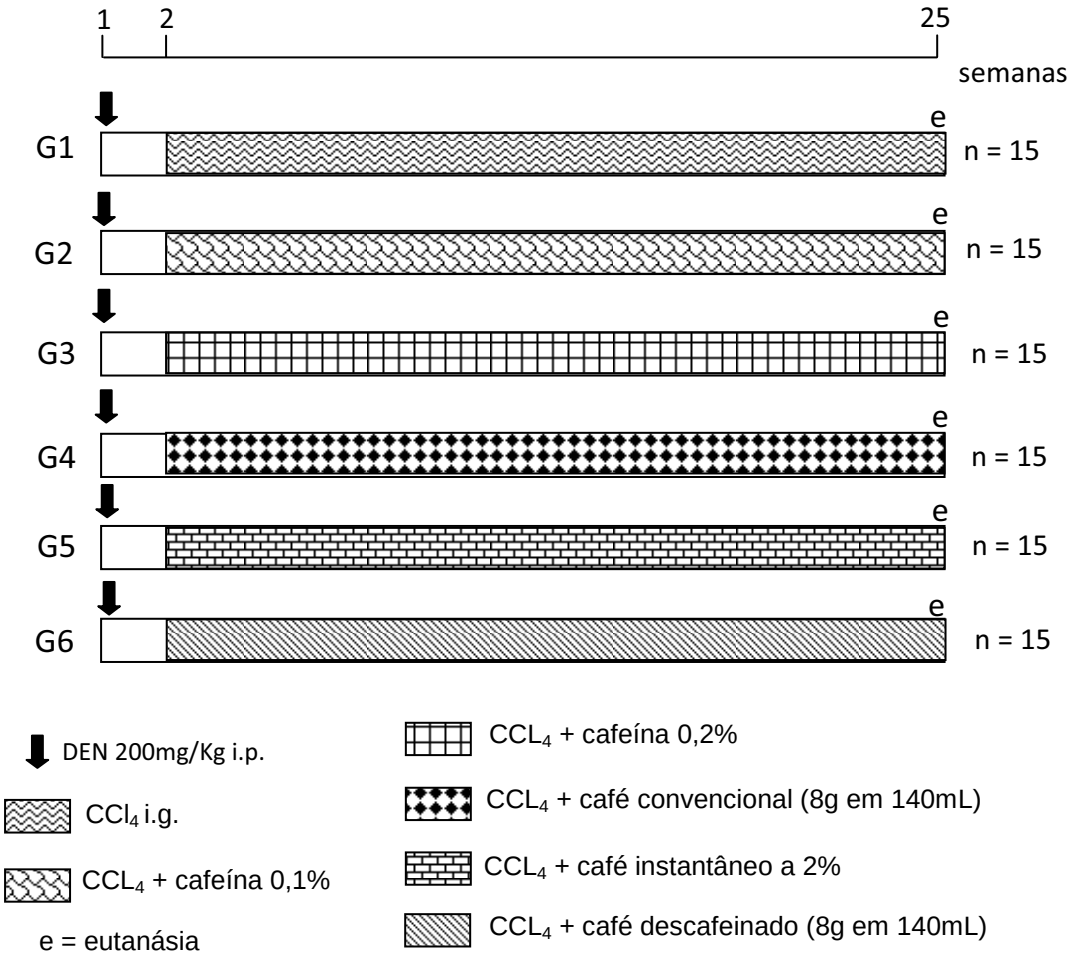
[1] Values are mean ± SD; [2] See experimental design; [a] Different from G1; $p < 0.05$. [§] G2 > G3, $p = 0.057$.

Anexo 4



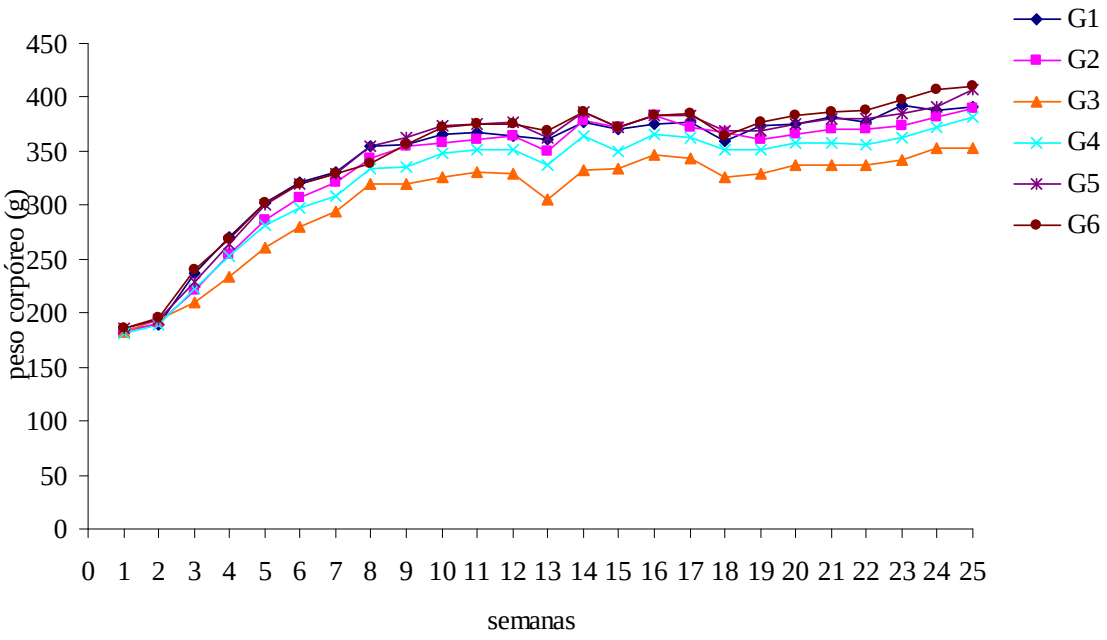
Hepatic Photomicrograpf (article 1)

Anexo 5



Delineamento Experimental (artigo 2)

Anexo 6 (artigo 2)



Evolução de peso corpóreo médio ao longo de 25 semanas de experimento. G1 = controle positivo; G2 = cafeína 0,1%; G3 = cafeína 0,2%; G4 = café tradicional; G5 = café instantâneo; G6 = café descafeinado. ⬇ Semana 11 = aumento da dose de CCl_4 de 0,5mL/Kg/semana para 1,0 mL/Kg/semana.

Anexo 7: Ganho de peso e consumo médio diário por animal de ração e líquidos nos grupos experimentais ao final da semana 25[1] (artigo 2).

Grupos/tratamentos	Ganho de peso (g)	Consumo de ração (g/rato/dia)	Consumo de líquidos (mL/rato/dia)
G1 (controle)	205,14 ± 42,76[a,b]	19,03 ± 3,05[a]	27,41 ± 4,47[a]
G2 (cafeína 0,1%)	204,00 ± 23,25[a,b]	19,46 ± 3,23[a]	25,29 ± 3,06[a]
G3 (cafeína 0,2%)	171,85 ± 24,24[b]	16,46 ± 3,71[b]	17,64 ± 4,52[d]
G4 (café tradicional)	201,20 ± 37,70[a,b]	18,35 ± 2,85[a,b]	21,31 ± 3,75 [b,c]
G5 (café instant.)	222,69 ± 31,85[a]	19,37 ± 2,67[a]	24,60 ± 3,39[a]
G6 (café descaf.)	222,64 ± 33,29[a]	18,90 ± 2,40[a,b]	22,42 ± 3,15 [a,b]

[1] Valores expressos como média ± DP; [2] DEN = dietilnitrosamina (200 mg/Kg i.p.), CCl4 = tetracloreto de carbono (0,5 mL/Kg até a semana 10 e 1,0 mL/Kg da semana 11 até a 25); Letras diferentes em uma mesma coluna representam diferença estatística entre os grupos, $p \leq 0,006$.

Anexo 8: Incidência de lesões hepáticas analisadas pela coloração de HE nos grupos experimentais ao final da semana 25 (artigo 2).

Grupos[1]	**G1**	**G2**	**G3**	**G4**	**G5**	**G6**
número de ratos	8	12	13	15	13	10
cistos biliares	1 (12,5%)	1 (8,33%)	2 (15,38%)	1 (6,67%)	1 (7,69%)	1 (10%)
hiperplasia de ductos biliares	5 (62,5%)	3 (25%)	2 (15,38%)[§]	8 (53,33%)	6 (46,15%)	4 (40%)
infiltrado inflamatório	0	2 (16,67%)	1 (7,69%)	2 (13,33%)	1 (7,69%)	1 (10%)
Esteatose focal	6 (75%)	3 (25%)[§,b]	4 (30,77%)[§,f]	7 (46,67%)[f]	10 (76,92%)	9 (90%)[b]
FCC/FCE[2]	8 (100%)	12 (100%)	13 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	10 (100%)
FCB[3]	7 (87,5%)	9 (75%)	12 (92,31%)	13 (86,67%)	11 (84,61%)	9 (90%)
degeneração cística	0	3 (25%)	1 (7,69%)	1 (6,67%)	0	1 (10%)
hiperplasia regenerativa	1 (12,5%)	0	3 (23,08%)	1 (6,67%)	2 (15,38%)	0
adenoma	7 (87,5%)	11 (91,67%)	12 (92,31%)	14 (93,33%)	11 (84,61%)	10 (100%)
colangioma	2 (25%)	0	0	1 (6,67%)	1 (7,69%)	0
lesão mista adenoma/colangioma	1 (12,5%)	0	0	1 (6,67%)	0	2 (20%)
colangiofibrose	2 (25%)	0	1 (7,69%)	1 (6,67%)	0	0
fibrose grau I	1 (12,5%)	5 (41,67%)	4 (30,77%)	3 (20%)	2 (15,38%)	4 (40%)
fibrose grau II	3 (37,5%)	6 (50%)	3 (23,08%)	4 (26,67%)	7 (53,85%)	5 (50%)
fibrose grau III	4 (50%)	1 (8,33%)	6 (46,15%)	8 (53,33%)[b,f]	4 (30,77%)	1 (10%)

[1]Ver delineamento experimental; [2]FCC – focos de células claras, FCE – focos de células eosinofílicas; [3]FCB – focos de células basofílicas; [b,f] Diferença em relação aos grupos G2 e G6 respectivamente $p < 0,04$; [§] tendência a significância em relação ao grupo G1 $0,056 \leq p \leq 0,08$;

Anexo 9: Valores de colesterol total (mg/dL), lipoproteína de alta densidade (HDL, sigla do termo em inglês) (mg/dL), triglicérides (mg/dL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL, sigla to termo em inglês) (mg/dL)[1] ao final da semana 25[1] (artigo 2).

Grupos/tratamentos[2]	Colesterol Total (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Triglicérides (mg/dL)	LDL (mg/dL)
G1 (controle +)	68,0 ± 10,89	49,14 ± 5,21[a]	40,86 ± 9,19	10,69 ± 6,15[b]
G2 (cafeína 0,1%)	75,92 ± 19,26	52,69 ± 9,36	40,50 ± 14,86	15,73 ± 9,50
G3 (cafeína 0,2%)	95,25 ± 21,49	64,83 ± 12,89	42,50 ± 12,49	21,99 ± 9,22
G4 (café tradic.)	86,4 ± 32,40	53,93 ± 15,03	39,31 ±13,42	26,29 ± 17,20
G5 (café instant.)	75,23 ± 6,62	48,00 ± 18,97[a]	45,17 ± 6,84	18,38 ± 12,91
G6 (café descaf.)	64,89 ± 17,19[a]	46,33 ± 9,86[a]	47,63 ± 18,70	10,63 ± 5,61[b]

[1] Valores expressos como média ± DP; [2] Ver delineamento experimental; $p < 0,05$. [a,b] Diferença em relação aos grupos G3 e G4 respectivamente, $p<0,05$.