UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área Nutrição Experimental

**Inibição de danos em DNA e alteração da expressão
gênica em ratos Wistar tratados com as hortaliças
couve e repolho (*Brassica oleracea*) e submetidos à
hepatocarcinogênese química**

Maria Aderuza Horst

Tese para Obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador: Prof. Tit. Franco Maria Lajolo

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do conjunto das Químicas da
USP.

H819i Horst, Maria Aderuza
Inibição de danos em DNA e alteração da expressão gênica
em ratos Wistar tratados com as hortaliças couve e repolho
(*Brassica oleracea*) e submetidos à hepatocarcinogênese
química / Maria Aderuza Horst. – São Paulo, 2007.
128p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental

Orientador: Lajolo, Franco Maria

1. Alimentos funcionais : Ciência dos Alimentos 2.
Carcinogênese química 3. Expressão gênica I. T. II. Lajolo,
Franco Maria, orientador.

641.1 CDD

Maria Aderuza Horst

**Inibição de danos em DNA e alteração da expressão gênica
em ratos Wistar tratados com as hortaliças couve e
repolho (*Brassica oleracea*) e submetidos à
hepatocarcinogênese química**

COMISSÃO JULGADORA DA TESE PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

Prof. Tit. Franco Maria Lajolo
Orientador/Presidente

Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno
1º. examinador

Prof. Dr. Luiz Fernando Barbisan
2º. examinador

Profa. Tit. Maria Lúcia Zaidan Dagli
3º. examinador

Prof. Dr. Thomas Prates Ong
4º. examinador

São Paulo, 19 de outubro de 2007.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Maria Aderuza Horst no Programa: Ciência dos Alimentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 19 dias do mês de outubro de 2007, no(a) Anfiteatro realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Maria Aderuza Horst, apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos - Área: Nutrição Experimental, intitulada:

"Inibição de danos em DNA e alteração da expressão gênica em ratos Wistar tratados com as hortaliças couve e repolho (Brassica oleracea) e submetidos à hepatocarcinogênese química"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Franco Maria Lajolo	Presidente	FCF - USP	A
Maria Lucia Zaidan Dagli	Titular	FMVZ - USP	A
Fernando Salvador Moreno	Titular	FCF - USP	A
Thomas Prates Ong	Titular	FCF - USP	A
Luis Fernando Barbisan	Titular	UNESP - Externo	A
Resultado Final:			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Monica Dealis Perussi *Monica Dealis Perussi*, Secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 19 dias do mês de outubro de 2007.

Maria Lucia Zaidan Dagli
Maria Lucia Zaidan Dagli

Thomas Prates Ong
Thomas Prates Ong

Fernando Salvador Moreno
Fernando Salvador Moreno

Luis Fernando Barbisan
Luis Fernando Barbisan

Franco Maria Lajolo
Franco Maria Lajolo
Orientador(a)

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

Impresso em: 19/10/2007

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:

Aos meus pais Helena e José, especialmente a minha mãe, pela coragem de me deixar escolher e seguir o meu próprio caminho, sei o quanto foi difícil conviver com a minha ausência, pois tive que conviver com a sua. Por seu incentivo e dedicação. Você é a melhor mãe do mundo.

Minha tia Neusa, em quem sempre encontrei apoio. Por nunca duvidar de que eu sou uma pessoa capaz. Seus conselhos e seu otimismo sempre me ajudaram a acreditar que tudo é possível.

Ao meu querido Alessandro, amor da minha vida, por seu amor incondicional, carinho e compreensão. Por sua confiança e conselhos, sempre me incentivando a vencer os obstáculos. Por toda a sua dedicação e apoio. Você é meu porto seguro. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS:

A tarefa de agradecer as pessoas que colaboraram para a realização deste trabalho realmente não é fácil, sinto que por lapso de memória posso deixar alguém importante sem agradecimento.....mas recorrendo a todas as minhas lembranças eu agradeço:

À Deus;

Ao meu orientador, Franco Maria Lajolo, por me receber como aluna e confiar em minha capacidade de aprendizado. Por direcionar este trabalho em momentos cruciais, quando eu não sabia que direção tomar. Admiro a sua inteligência e competência. Aprendi muito com seus conselhos, obrigada por me tornar digna de receber o título de doutor.

Ao Professor Fernando Salvador Moreno, por me receber em seu laboratório, por seus conselhos, e por me estender a mão em momentos difíceis, você me ensinou que quando os resultados não são exatamente o que esperamos não é o fim do mundo, que resultados negativos continuam sendo resultados, e isso é pesquisa. Por sua contribuição indispensável a esse trabalho.

Ao professor Thomas Prates Ong, por todos os conhecimentos e ensinamentos compartilhados, pela paciência e colaboração, enfim por esses quatro anos e meio que acompanhou de perto o meu trabalho e a minha jornada, oferecendo conselhos e ajuda, imprescindíveis para realização deste.

À professora Maria Lúcia Zaidan Dagli, por sua gentileza e disposição em participar de todas as minhas bancas, e sempre com colocações e sugestões importantes para este trabalho.

Ao professor Eduardo Purgatto, por sua ajuda e na execução das técnicas de biologia molecular, além das suas explicações, discussões e correções;

À professora Beatriz Rosana Cordenunsi, por sua preocupação com o bem estar de todos os alunos do laboratório fornecendo segurança aos que com ela trabalham. Por sempre me receber pra ouvir a minha "choradeira", com a firmeza de uma educadora, mas com o carinho de uma mãe.

À professora Maria Inês Genovese, por seus conselhos e amizade.

Ao demais professores do laboratório, Elizabeth Wenzel e João Roberto Nascimento;

À professora Silvia Cozzolino, pela amizade e oportunidades de crescimento profissional. O seu amor e dedicação à ciência da nutrição servem de exemplo para nós nutricionistas;

À minha família, avô, tios, tias e os muitos primos, que sempre torceram por mim e me ajudaram a espairecer em momentos próprios com churrasco, cerveja e muito truco;

Aos meus irmãos Nayane, Janos, Gilberto e Ilson, sem vocês a vida não seria a mesma;

Às minha queridas amigas Joseli, Araceli, Mayane, Keyla e Valérie, apesar da distância, saber que sempre posso contar com vocês me dá a certeza de que as amizades verdadeiras são eternas;

Aos *Balotões*, ex companheiros de república, vivemos juntos uma grande história de amizade e companheirismo, isso jamais poderá ser apagado de nossa memória, Cris, Edu, Gu e Sal, vocês são inesquecíveis. Obrigada por participarem da minha vida.

Às minhas amigas especiais, Ana Cristina, Lúcia Helena e Neuza Mariko, muitas conversas, jantares, risos e conselhos;

À Márcia mãe preta, por tornar o laboratório um ambiente mais alegre e organizado, também por seus conselhos e amizade;

À Eliana, uma segunda mãe encontrada em São Paulo, por seus cuidados e por me ajudar a atravessar a rua;

À Milana, amiga legal, especialmente por sua ajudinha com o inglês;

À Maritsa e Estela, pela amizade e carinho;

Aos amigos, colegas e técnicos do laboratório de Química e Bioquímica de alimentos;

Aos amigos e colegas do laboratório de Dieta Nutrição e Câncer, por dividirem o seu espaço comigo; e ao Renato Heidor, por sua dedicação em me ensinar a técnica do cometa;

Ao pessoal do biotério, por sua simpatia, prontidão e competência em atender aos meus pedidos;

Ao professor Richard Bennett, pela análise de glicosinolatos;

Aos professores Hélio Vannucchi e Alceu Jordão pela quantificação de luteína;

À Maico T. Cunha, pelo incentivo inicial e por me apresentar à USP;

Ao pessoal da secretaria de Alimentos e Nutrição Experimental, Cleo, Edilson e Mônica, e aos da secretaria de Pós-Graduação Elaine e Jorge;

Aos ratos;

À Capes e ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudos;

"Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque tornar-se-á, assim, uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser aprendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto"

Albert Einstein.

RESUMO

Inibição de danos em DNA e alteração da expressão gênica em ratos Wistar tratados com as hortaliças couve e repolho (*Brassica oleracea*) e submetidos a hepatocarcinogênese química. 2007. 119f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, sendo responsável por aproximadamente 7,6 milhões de óbitos. Entretanto, pesquisadores alertam para uma associação inversa entre o consumo de frutas e hortaliças e o desenvolvimento de neoplasias, desta forma a organização mundial da saúde sugere, dentre outras medidas para controle do câncer, o aumento do consumo de frutas e hortaliças. Nesse contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar os eventuais efeitos quimiopreventivos das hortaliças *Brassicas*, couve (C) e repolho (R). Realizaram-se dois experimentos sendo o primeiro, o modelo de hepatocarcinogênese de Ito, onde as hortaliças foram fornecidas durante 8 semanas na água de beber (10% p/v), animais que receberam apenas água foram utilizados como controle. Nesse experimento não houve inibição ($P>0,05$) de lesões pré-neoplásicas hepáticas positivas para glutathione S-transferase forma placentar e não houve indução ($P>0,05$) da apoptose nos grupos tratados com C ou R. Contudo, observou-se redução ($P<0,05$) de danos em DNA hepático e aumento ($P<0,05$) da concentração hepática de luteína de ratos tratados com C e R, quando comparados a ratos controle. No segundo experimento as hortaliças foram fornecidas durante 8 semanas na água de beber (20% p/v), e os animais foram submetidos a aplicação do carcinogênico hepático 24h antes da eutanásia. Não houve redução ($P>0,05$) de danos em DNA, contudo a concentração do aduto de DNA 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) e foi elevada ($P<0,05$) em animais tratados com R quando comparados a tratados com C e controles. Com relação à expressão diferencial de genes, 29 genes foram diferencialmente expressos em fígado, dentre eles o gene da 8-oxoguanina-DNA-glicosilase (enzima de reparo do DNA), foi hipoexpressa no grupo tratado com R, o que pode explicar o aumentado valor de adutos no mesmo grupo. O cólon apresentou 31 genes com diferença de expressão, onde 5 genes estão relacionados ao metabolismo de xenobióticos.

Palavras Chave: Hepatocarcinogênese química. Hortaliças *Brassicas*. Expressão diferencial de genes. Danos em DNA. 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, Quimioprevenção.

ABSTRACT

Inhibition in DNA damages and differential gene expression in Wistar rats treated with kale and cabbage (*Brassica oleracea*) and submitted to chemical hepatocarcinogenesis. 2007. 119p. Thesis (Doctorate) – School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2007.

Cancer is the major cause of death in the world, being responsible for approximately 7.6 million deaths. However, there is a hypothesis of an inverse association between fruit and vegetable consumption and the development of cancer. Therefore, the World Health Organization suggests, among other actions for controlling cancer, the increase in vegetable and fruit consumption. The aim of this work was to evaluate eventual chemopreventive effects of *Brassicas* vegetables, kale (K) and cabbage (C). Two experiments were done: the first one was Ito's hepatocarcinogenesis model, where vegetables were provided during 8 weeks in the rats' drinking water (10% w/v). Animals that received only water were considered control. In this experiment, there was no inhibition ($P < 0,05$) of glutathione S-transferase placental form positive preneoplastic lesions and, also, there was no induction ($P < 0,05$) of apoptosis in the groups treated with K or C. However, it was observed a reduction ($P < 0,05$) in hepatic DNA damages and an increase ($P < 0,05$) in lutein hepatic concentration of rats treated with K or C, when compared to the control. In the second experiment, the vegetables were provided during 8 weeks in the rats' drinking water (20% w/v), and animals were submitted to carcinogenic application 24h before euthanasia. There was no reduction ($P < 0,05$) in DNA damages, however there was an increase ($P < 0,05$) in the concentration of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) DNA in animals treated with C when compared to the ones treated with K and control. In relation to the differential gene expression, 29 genes were differently expressed in the liver, such as the 8-oxoguanine-DNA-glycosylase gene, which was downregulated in the group treated with C. This might explain the increased value of adducts in the same group. Colon presented 31 genes with difference in expression, whereas 5 genes are related to xenobiotic metabolism.

Key Words: Chemical hepatocarcinogenesis. *Brassica* vegetables. Differential gene expression. DNA damage. 8-hydroxy-2-deoxyguanosine. Chemoprevention.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.3 CÂNCER.....	5
2.4 CARCINOGENESE QUÍMICA E CARCINOGENICOS	10
2.4.1 DIETILNITROSAMINA (DEN)	12
2.4.2 HEPATOCARCINOGENESE E MODELO DE “ITO”	13
2.5 ALQUILAÇÃO DO DNA E MUTAGENICIDADE INDUZIDOS POR DEN	14
2.6 ENZIMAS METABOLIZADORAS DE XENOBIÓTICOS	15
2.7 OXIDAÇÃO DO DNA E FORMAÇÃO DA 8-OHdG	18
2.1 ALIMENTAÇÃO, NUTRIÇÃO E CÂNCER	21
2.2 QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER POR HORTALIÇAS BRASSICAS.....	25
2.8 NUTRIGENÔMICA	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL I - MODELO DE HEPATOCARCINOGENESE.....	33
4.1.1 PREPARO DO SUCO	33
4.1.2 ANIMAIS	34
4.1.3 MODELO DE HEPATOCARCINOGENESE DE ITO.....	35
4.1.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL I.....	35
4.1.5 EUTANÁSIA.....	38
4.1.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS LPN GST-P POSITIVAS	38
4.1.7 QUANTIFICAÇÃO DE CORPÚSCULOS APOPTÓTICOS (CA) HEPÁTICOS	40
4.1.8 ANÁLISE DE DANOS EM DNA HEPÁTICO TRATADO <i>EX VIVO</i> COM H ₂ O ₂	41
4.1.9 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES HEPÁTICAS DE LUTEÍNA	43
4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL II – APLICAÇÃO DO CARCINÓGENO DEN.....	44
4.2.1 PREPARO DO SUCO	44
4.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSINOLATOS	44
4.2.3 ANIMAIS	44
4.2.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL II.....	45
4.2.5 APLICAÇÃO DO CARCINOGENICO	45
4.2.6 ANÁLISE DE DANOS EM DNA.....	48
4.2.7 QUANTIFICAÇÃO DE 8-OHdG EM DNA HEPÁTICO	48
4.2.8 ANÁLISE DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (MACROARRAY)	51
4.3 RT-PCR	54
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5 RESULTADOS	58
5.1 OBSERVAÇÕES GERAIS RELATIVAS AOS RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO PROTOCOLO EXPERIMENTAL I	58
5.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE LPN HEPÁTICAS.....	62
5.3 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE	64
5.4 COMETA ALCALINO EM DNA HEPÁTICO SENSIBILIZADO COM H₂O₂	65
5.5 QUANTIFICAÇÃO HEPÁTICA DE LUTEÍNA.....	66
5.6 OBSERVAÇÕES GERAIS RELATIVAS AOS RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO PROTOCOLO EXPERIMENTAL II	67
5.7 QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSINOLATOS	70
5.8 COMETA ALCALINO	71
5.9 ELISA PARA 8-OHdG	72
5.10 MACROARRAY	73
5.11 RT-PCR	82
5.11.1 FÍGADO	82

5.11.2 CÓLON.....	85
6 DISCUSSÃO	87
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
REFERÊNCIAS.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da DEN_____	36
Figura 2: Biotransformação da DEN e mecanismo de formação de adutos de DNA._____	38
Figura 3: Representação esquemática da ativação e destoxificação de carcinogênicos_____	40
Figura 4: Representação esquemática do protocolo experimental I_____	52
Figura 5: Representação esquemática do protocolo experimental II _____	62
Figura 6: Evolução do peso de ratos Wistar submetidos ao protocolo experimental I_____	71
Figura 7: Consumo de ração de ratos Wistar submetidos ao protocolo experimental I_____	71
Figura 8: Consumo de líquido de ratos Wistar submetidos ao protocolo experimental I_____	72
Figura 9: Fotomicrografia de corte histológico de fígado de ratos Wistar submetidos ao protocolo experimental I_____	75
Figura 10: Quantificação de corpúsculos apoptóticos_____	77
Figura 11: Fotomicrografia dos cometas_____	78
Figura 12: Concentração hepática de luteína de ratos Wistar submetidos ao protocolo experimental I_____	79
Figura 13: Evolução do peso de ratos Wistar submetidos ao protocolo experimental II_____	80
Figura 14: Consumo de ração de ratos Wistar submetidos ao protocolo experimental II_____	80
Figura 15: Consumo de líquido de ratos Wistar submetidos ao protocolo experimental II_____	81
Figura 16: Concentração de 8-OHdG (8-hidroxideoxi-2-guanosina) em DNA hepático de ratos Wistar_____	85
Figura 17 Agrupamento hierárquico não supervisionado em genes de amostras de fígado de ratos submetidos ao protocolo experimental II_____	89
Figura 18 Agrupamento hierárquico não supervisionado em genes de amostras de cólon de ratos submetidos ao protocolo experimental II_____	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: ¹Primers Cólon; ²Primers Cólon; ³ Primer Controle.

Tabela 2: Peso Corporal inicial e final, peso absoluto e relativo do fígado e consumo de ração e de líquido de ratos Wistar submetidos ao protocolo experimental I _____ 73

Tabela 3: Análise morfológica de LPN GST-P positivas de ratos Wistar submetidos ao protocolo experimental I _____ 74

Tabela 4: Número de Corpúsculos Apoptóticos hepáticos submetidos ao protocolo experimental I _____ 76

Tabela 5: Comprimento dos “cometas” de DNA hepático de ratos Wistar submetidos ao protocolo experimental I _____ 78

Tabela 6: Peso Corporal inicial e final, peso relativo do fígado, consumo de ração e de líquido de ratos Wistar submetidos ao protocolo experimental II _____ 81

Tabela 7: Conteúdo de glicosinolatos nas hortaliças couve e repolho utilizadas no experimento II _____ 82

Tabela 8: Comprimento dos cometas de fígado de ratos Wistar submetidos ao protocolo experimental II _____ 83

Tabela 9: Genes diferencialmente expressos em fígado de ratos submetidos ao protocolo experimental II _____ 86

Tabela 10: Genes diferencialmente expressos em cólon de ratos submetidos ao protocolo experimental I _____ 91

1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado em todo o mundo um grave problema de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou que o número de mortes em 2005, com causa relacionada a essa doença foi 7,6 milhões de pessoas. Mais de 70% de todas as mortes por câncer ocorrem em países pobres ou subdesenvolvidos, onde os recursos disponíveis para estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento, são limitados ou inexistentes.

No Brasil, os números são igualmente alarmantes sendo que as estimativas para o ano de 2006 alertaram para a ocorrência de 472.050 casos novos (INCA, 2005).

Com base em projeções, se as mortes por câncer continuarem a aumentar, estima-se que 9 milhões de pessoas morrerão de câncer em 2015, e 11,4 milhões em 2030, caso não sejam tomadas as devidas medidas preventivas (www.who.int/topics/cancer, em 01/06/2007). Como fatores responsáveis pelo aumento do número de mortes por câncer, destacam-se o aumento da expectativa de vida da população, bem como a adoção de estilos de vida denominados “ocidentalizados”. Por outro lado, a OMS ressalta que cerca de 1/3 desses novos casos de câncer podem ser prevenidos pela eliminação do tabagismo e de infecções como o vírus da hepatite C e o *Helicobacter Pylori* e, é claro, por modificações alimentares (IARC, 2002).

A OMS sugere em seu programa de controle do câncer, reduzir a exposição a fatores de risco, tais como o tabagismo, o consumo de álcool, o sedentarismo, o excesso de exposição ao sol, e as dietas não saudáveis (Ninth plenary meeting, 25 May 2005 –Committee B, third report).

Modificações na alimentação são consideradas importantes e efetivas para a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis. Fatores dietéticos indicados para a redução do risco de câncer incluem aumento do consumo de fibras alimentares, de hortaliças (especialmente as crucíferas) e de frutas fontes de vitaminas e minerais antioxidantes (SAMARANAYAKE, 2000). A OMS ressalta a importância do consumo diário de pelo menos 400 g de frutas e hortaliças para a redução do risco do desenvolvimento do câncer (OMS, 2002).

A importância do consumo de frutas e hortaliças está relacionada à diversos inibidores da carcinogênese, presentes como constituintes naturais dos alimentos. Por essa razão, muitos estudos são direcionados para a elucidação da relação dieta, nutrição e câncer. Mais de 200 estudos epidemiológicos apresentam dados onde o consumo elevado de frutas e hortaliças está associado com a redução do risco do desenvolvimento de câncer (DOLL & PETO, 1981). Nesse sentido, muitos grupos de pesquisa dedicam-se ao estudo do câncer e de estratégias de quimioprevenção, considerada como a mais promissora forma de se controlar a doença (SOLT & FARBER, 1976; PITOT & DRAGAN, 1991; KASSIE *et al.*, 1996; TALALAY & FAHEY, 2001; MORENO *et al.*, 2007). A maioria destes pesquisadores utiliza frutas, hortaliças ou seus metabólitos secundários, chamados de compostos bioativos de alimentos (CBAs), como potenciais agentes quimiopreventivos.

Trabalhos comprovam que CBAs, comumente presentes em alimentos de origem vegetal, como compostos fenólicos, carotenóides e glicosinolatos, podem inibir a carcinogênese química em animais de laboratório. Esse efeito pode estar relacionado à habilidade desses agentes de influenciar o metabolismo e a excreção do carcinogênico e de aumentar a capacidade celular de combate ao estresse oxidativo (COLLINS, 2005).

Dentre os CBAs relacionados à carcinogênese hepática, pode-se destacar o importante papel dos carotenóides luteína e licopeno (TOLEDO *et*

al., 2003), bem como dos glicosinolatos, presentes em especial nas hortaliças da família das crucíferas (TALALAY & FAHEY, 2001).

Muitos estudos sugerem que os efeitos benéficos das frutas e das hortaliças ocorrem devido à presença dos CBAs nesses alimentos, o que leva muitos pesquisadores a utilizar os CBAs isolados para avaliar os seus efeitos. Esse tipo de estudo é válido para melhor elucidação dos mecanismos de ação dos CBAs, porém torna-se necessária a realização de estudos que utilizem alimentos “inteiros”, uma vez que a combinação de CBAs entre si e com a matriz do alimento pode apresentar efeitos diferentes daqueles encontrados em experimentos que utilizam os compostos isolados.

Com relação às hortaliças, a família das Crucíferas, principalmente o gênero *Brassica*, espécie *oleracea*, que inclui a couve e o repolho, merece atenção especial por suas propriedades quimiopreventivas (KUSHAD *et al.*, 2004). Evidências apontam que o potencial quimiopreventivo dessas hortaliças está relacionado principalmente ao seu alto teor de glicosinolatos e seus produtos de hidrólise, capazes de modular a expressão e a atividade de enzimas metabolizadoras de xenobióticos (LAMPE, 2003).

As hortaliças da família das *Brassicac*s são consideradas promissoras para a redução do risco do desenvolvimento de vários tipos de câncer (VERHOEVEN *et al.*, 1997). Um estudo clínico conduzido na China, em indivíduos com alto risco para o desenvolvimento de hepatocarcinoma celular, demonstrou que o consumo de uma infusão de brócolos reduziu a excreção urinária de adutos de DNA relacionados ao câncer hepático, o que sugere um potencial efeito quimiopreventivo dessa hortaliça (KENSLER *et al.*, 2005).

Diante desses dados torna-se iminente a necessidade da adoção de políticas de saúde pública para controlar o câncer. Uma dessas medidas pode ser a quimioprevenção, pois ela é considerada uma forma de reduzir o risco do desenvolvimento da doença, pela administração de agentes naturais

ou sintéticos capazes de reverter ou suprimir os estágios iniciais da carcinogênese (FORMAN, 2004).

Diante do aumento na incidência de neoplasias e a crescente preocupação com estratégias de quimioprevenção, torna-se necessário o estudo detalhado de alimentos que possam apresentar alguma atividade protetora, especialmente as hortaliças, e o estabelecimento de seus meios de atuação, bem como as doses efetivas para o controle ou a redução do risco do desenvolvimento de neoplasias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.3 Câncer

O termo câncer se refere a um grupo amplo de doenças complexas caracterizadas por alterações celulares de diferentes origens (GREAVES, 2002). É um importante problema de saúde pública em diversos países, inclusive no Brasil. É causa de mais de 7 milhões de mortes anuais no mundo e mais de 10 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer todos os anos. Há uma estimativa de que em 2020 esse número aumente em 50%, caso não sejam tomadas medidas preventivas (OMS, 2002).

No Brasil, a última publicação do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou, para o ano de 2006, a ocorrência de 472.050 casos novos. Os tipos mais incidentes, à exceção do de pele não melanoma, seriam os de próstata e pulmão no sexo masculino, e mama e colo do útero para o sexo feminino (INCA, 2005).

O desenvolvimento do câncer é chamado de carcinogênese e consiste em um processo ativo e dinâmico induzido em organismos vivos por agentes de natureza física, biológica ou química. Exemplos de tais agentes carcinogênicos são a radiação ultravioleta, o vírus da hepatite B (HBV) e as aminas heterocíclicas, respectivamente (PITOT & DRAGAN, 1991).

Dentre os princípios das bases moleculares encontra-se o dano genético como sendo responsável pelo início do processo carcinogênico. A neoplasia se desenvolve como resultado de modificações aleatórias, cumulativas e não letais, na estrutura do genoma celular. Mais especificamente ocorrem danos em genes que controlam o ciclo celular, como proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes que controlam o processo de morte celular programada (apoptose). Lesões específicas na molécula de DNA incluem mutações pontuais, amplificação ou deleção de

genes, inserções, translocações e ganhos ou perdas de cromossomos ou parte deles (STEVENS & LOWE, 2002).

O resultado fenotípico das alterações genotípicas citadas é a perda dos mecanismos de controle celular, favorecendo a possibilidade de crescimento e de progressão neoplásica pelo acúmulo de células filhas, geneticamente instáveis e culminando em metástase. Morfologicamente esses eventos são traduzidos na perda progressiva da diferenciação celular (STEVENS & LOWE, 2002).

A carcinogênese é um processo complexo e pode ser dividida em três etapas básicas, denominadas iniciação, promoção e progressão. A fase de iniciação é caracterizada por alteração do material genético, que pode ou não resultar em mutação. Embora a mutação não necessariamente resulte no desenvolvimento do câncer, ela indica risco aumentado para neoplasia. É considerada uma fase irreversível (AMES *et al.*, 1995).

A iniciação é um evento primordial para a carcinogênese e ocorre em poucas células do tecido, geralmente pela ação de substâncias genotóxicas com capacidade de induzir mudanças genéticas herdáveis nas células. Esses genotóxicos têm a capacidade de causar danos em DNA, induzindo assim mutações. Do ponto de vista de quimioprevenção, há grande interesse em bloquear essa etapa.

A fase de promoção ocorre após o insulto celular. É caracterizada pela expansão clonal de células iniciadas, que formam populações de células cancerosas e pela conversão da célula iniciada em célula pré-maligna. É um processo reversível e que apresenta longo período de latência, sendo este um ponto estratégico para ação de agentes quimiopreventivos contra o câncer.

A fase de progressão é um processo irreversível e que ocorre em consequência de dano adicional ao cromossomo, resultando em divisão celular incontrolada devido à reduzida dependência dessas células aos

fatores de crescimento. É o estágio final da carcinogênese onde ocorre a conversão de células pré-neoplásicas em populações de células invasivas e metastáticas (PITOT & DRAGAN, 1996).

A capacidade dos carcinogênicos de se ligarem aos ácidos nucléicos foi demonstrada pela primeira vez *in vivo* por Magee e Farber (1962). Assim, grupamentos eletrofílicos altamente reativos de substâncias carcinogênicas promovem ataques a grupamentos nucleofílicos da molécula de DNA, formando adutos que, caso não eliminados pelo sistema de reparo da célula, poderão originar transições, transversões e pequenas deleções no genoma celular, iniciando a carcinogênese.

Dois tipos de agentes carcinogênicos genotóxicos podem causar danos em DNA levando a transformações neoplásicas. Os primeiros apresentam grupamentos eletrofílicos em sua estrutura e são geralmente de origem exógena. Os segundos são espécies reativas de oxigênio (EROs), que têm sua origem principalmente endógena, pela própria oxidação celular normal (SILINS, 2003).

Dois eventos de extrema importância na carcinogênese são a proliferação celular e a apoptose. A desregulação de uma dessas vias, ou de ambas, leva à formação da neoplasia.

A proliferação celular é considerada como um fator essencial na carcinogênese humana e experimental, sendo necessária para a fixação do dano causado pelo agente carcinogênico, no DNA celular (TANAKA, 1997).

Para que ocorra a divisão celular é iniciado um processo complexo que envolve a ativação de várias proteínas, dentre as quais destacam-se os fatores de crescimento e seus receptores, bem como proteínas que estimulam a proliferação e o desenvolvimento da célula normal. Assim a divisão celular é positivamente regulada ou estimulada por vias sinalizadoras (STEWART, *et al.*, 2003).

Genes estimuladores da proliferação celular incluem os proto-oncogenes, enquanto os inibidores são chamados de genes supressores de tumor. Mutações ou modificações na expressão desses genes conferem à célula vantagens de crescimento e desenvolvimento em relação às células normais.

Os genes supressores de tumor, ou anti-oncogenes, estão envolvidos com a inibição do fenótipo maligno, podendo ser inativados por mutações durante o processo da carcinogênese. Uma mutação que iniba esses genes resulta na perda de mecanismos naturais de controle da proliferação, promovendo multiplicação excessiva das células.

O gene supressor tumoral *p53* tem importante papel na inibição do ciclo celular, pois aumenta a transcrição do gene *p21*, inibidor de ciclinas dependentes de quinases (CDKs). Outros importantes inibidores das CDKs e do ciclo celular são o *p27* e o *p16* (STEWART, *et al.*, 2003).

Dessa forma, a proliferação celular desempenha um papel importante, e até mesmo crítico, nas várias etapas da carcinogênese de diversos órgãos e tecidos, ou seja, na iniciação, promoção e progressão.

Para manter a ordem tecidual os órgãos devem apresentar um balanço regulado entre o crescimento e a morte celular. A apoptose é descrita como morte fisiológica da célula, que ocorre pela ativação de genes apoptóticos. Esse processo é essencial para a embriogênese, desenvolvimento e homeostase tecidual de todo o organismo (RAFI, 2004).

Nesse sentido, o destino da célula é controlado por genes que estimulam a apoptose, a qual consiste em um tipo de morte celular distinta morfológica, bioquímica e molecularmente da necrose, e visa à eliminação de células em excesso ou indesejáveis de tecidos embrionários durante a involução de órgãos e na regressão de neoplasias. A apoptose é reconhecida como um fenômeno biológico de ampla ocorrência e que é complementar,

porém se opõe à proliferação celular, no sentido de manter a homeostasia tecidual. Por essa razão também é chamada de morte celular programada (COLUMBANO, 2000).

A apoptose é um mecanismo controlado e a sua desregulação pode desencadear várias doenças incluindo o câncer, doenças neurodegenerativas e doenças auto-imunes. Frequentemente fármacos quimioterapêuticos eliminam a neoplasia ativando a via bioquímica endógena de suicídio celular, ou seja, estimulando a apoptose (RAFI, 2004).

A morte celular programada também ocorre quando o mecanismo de reparo do DNA não é suficiente para evitar o dano genético. A célula mutada pode então ser eliminada do organismo por apoptose, que representa um mecanismo de proteção contra a transformação e o desenvolvimento da neoplasia, eliminando as células com dano genético ou que não respondem a estímulos proliferativos (KING & CIDLOWSKI, 1998).

Mais especificamente no processo de apoptose, células únicas inicialmente se retraem e se tornam densas. Há perda de água no interior do retículo endoplasmático da célula apoptótica, o que resulta em uma dilatação de cisternas. No núcleo, a cromatina se condensa, podendo ocorrer fragmentação do mesmo. Os corpúsculos apoptóticos então formados frequentemente contêm fragmentos de cromatina condensada e subsequente podem ser fagocitados por macrófagos ou por células vizinhas e digeridos pelos lisossomos celulares.

Células ou corpúsculos apoptóticos não atraem linfócitos relacionados mais especificamente às respostas inflamatórias. Portanto, para o organismo como um todo, a apoptose constitui um processo pelo qual células com danos (não reparados) ou desnecessárias podem ser rapidamente removidas (KING & CIDLOWSKI, 1998).

Descreve-se que os sinais iniciais da apoptose sejam o estímulo à atividade de proteases (caspases) e à alterações da superfície celular e reorganização do citoesqueleto. As caspases promovem o aumento da atividade de endonucleases envolvidas na degradação de substâncias intracelulares (SILINS, 2003).

A família de proteínas *Bcl-2* constitui uma classe importante de proteínas reguladoras de apoptose. Estas incluem as proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bad, Bak, Bcl-Xs, Bim, Bik) e as antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-X1, Bclw, Mcl1). Estas últimas desempenham papel crítico na regulação da apoptose e sua expressão é freqüentemente alterada em muitos cânceres humanos. Participam ainda de uma ampla variedade de cascatas de sinalização. Interações entre proteínas dessa família com outras resultam na morte ou não da célula. Essas proteínas são normalmente encontradas na mitocôndria celular (RAFI, 2004).

Propõe-se que a mitocôndria tenha um importante papel no processo apoptótico, pois se descreve que ela é responsável pela liberação de muitos fatores pro-apoptóticos, como o citocromo c. A proteína *Bcl-2* fosforila o citocromo c ainda dentro da mitocôndria, o que induz a ativação de proteases (caspases) que clivam o ácido aspártico e induzem uma cascata que pode resultar em apoptose (RAFI, 2004).

2.4 Carcinogênese Química e Carcinogênicos

A carcinogênese química é um processo que tem início com a exposição da célula a um agente carcinogênico. O alvo primário dos carcinogênicos é o DNA. Entretanto, os danos provenientes desses carcinogênicos nem sempre levam a mutação, pois a célula é munida de muitas enzimas destinadas ao reparo do DNA danificado.

Os carcinogênicos químicos podem ser classificados como agentes genotóxicos e não genotóxicos. Carcinogênicos genotóxicos reagem direta ou indiretamente (após ativação metabólica) com o DNA celular, formando adutos. Esses adutos de DNA aumentam a probabilidade de eventos mutacionais que podem resultar no desenvolvimento da neoplasia. Agentes não genotóxicos não reagem diretamente com o DNA, porém podem causar danos epigenéticos e conseqüentemente formar adutos (COOKE, *et al.*, 2003).

Os carcinogênicos têm ainda outra classificação, podem ser diretos, não necessitando de ativação prévia; ou indiretos (pró-carcinogênicos) os quais são convertidos a carcinogênicos definitivos após a metabolização por enzimas de fase I.

Dentre os carcinogênicos mais comuns destacam-se as aminas heterocíclicas e as nitrosaminas. As nitrosaminas são os carcinogênicos mais potentes em roedores. Essas substâncias são comumente encontradas em carnes conservadas, em produtos do tabaco, em solventes industriais, em bebidas alcoólicas e em carne de peixe. Compostos N-nitrosos também podem ser formados endogenamente, por exemplo, via nitrosaminação de substâncias ingeridas dos alimentos, da água ou do ar (BROWN, 1999). Sabe-se que as nitrosaminas produzem tumor em mais de quarenta espécies diferentes de animais, e são classificadas como prováveis carcinogênicas humanas (IARC, 2002).

O DNA também pode ser danificado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas durante o metabolismo normal da célula. Apesar de o oxigênio ser essencial a vida, ele pode originar diferentes EROs como parte do metabolismo normal, as quais podem iniciar vários processos degenerativos como envelhecimento, desenvolvimento de catarata, carcinogênese e doenças cardíacas (BALAK *et al.*, 1996).

Neste contexto o papel dos danos oxidativos em DNA celular na mutagênese e na carcinogênese tem atraído muita atenção. Muitos estudos sugerem um possível envolvimento de danos oxidativos em DNA no processo neoplásico (SHIMODA *et al.*, 1994, MARNETT, 2000, ISHIBA, 2003).

2.4.1 Dietilnitrosamina (DEN)

O carcinogênico químico dietilnitrosamina (DEN), também chamado de nitrosodietilamida, é um líquido amarelado com ponto de fusão entre 175 e 177°C. É solúvel em água, etanol, éter e solventes orgânicos. A DEN é extensivamente utilizada em modelos experimentais. A IARC concluiu que a DEN apresentou carcinogenicidade em todas as espécies animais testadas e essas foram evidências suficientes para classificá-la como provável carcinogênico humano (IARC, 2002). Apesar disso, ela pode ser encontrada em produtos de fácil acesso como no cigarro e na carne. Sua estrutura química é representada na figura 1.

Figura 1: Estrutura química da DEN.

A DEN é um carcinogênico indireto, ativado principalmente pela CYP 2E1 e utilizada como agente genotóxico, iniciador de lesões pré-neoplásicas e de tumores em modelos experimentais, principalmente de carcinogênese hepática. É um carcinogênico químico chave em grande número de investigações sobre dose-resposta em tecidos alvo, estratégias

quimiopreventivas, investigações celulares e mecanismos moleculares do desenvolvimento do câncer (ITO *et al.*, 2000).

Estudos relacionando a DEN com a formação e reparo de adutos de DNA, proliferação celular, lesões pré-neoplásicas e formação de tumor aumentam o entendimento do processo neoplásico relacionado com compostos reativos com o DNA.

Dentre as espécies testadas para avaliar o potencial carcinogênico da DEN estão camundongos que apresentaram neoplasias no fígado, no trato gastrointestinal e na pele, além de neoplasias respiratórias e hematopoiéticas; porcos e hamsters desenvolveram cânceres hepáticos, gastrintestinais e no trato respiratório; coelhos, cães e macacos apresentaram apenas neoplasias no fígado; e finalmente os ratos apresentaram tumores no fígado, rins e no trato gastrointestinal (VERNA *et al.*, 1996).

2.4.2 Hepatocarcinogênese e Modelo de “Ito”

O hepatocarcinoma celular (HCC) é um dos cânceres mais comuns no mundo (aproximadamente 467 mil novos casos por ano). Infecções crônicas como hepatite viral B e C, ingestão de alimentos contaminados com carcinogênicos químicos (especialmente a aflatoxina B1) e abuso no consumo de álcool são considerados os maiores fatores de risco para o desenvolvimento do HCC (TANNAPFEL & WITTEKIND, 2002).

A hepatocarcinogênese apresenta características semelhantes em roedores e humanos. Algumas alterações comuns aos dois grupos são a hipometilação anormal de DNA, o aumento da expressão de genes reguladores de sinais mitogênicos, as mudanças nos genes supressores de tumor e a desregulação de genes controladores do ciclo celular (FEO, 2000).

Dentre os diversos modelos de hepatocarcinogênese em ratos, destaca-se o de “Ito”. Esse modelo é bastante semelhante ao clássico de Solt

e Farber (1976), embora não empregue 2-acetilaminofluoreno para a seleção de hepatócitos iniciados (ITO, *et al.*, 1988; 1997; 2000; 2003; IMAIADA, 1981).

Em 1976, já com uma longa experiência em estudos experimentais com roedores, Solt e Farber desenvolveram um protocolo em que focos de células alteradas podem ser induzidos em ratos com quatro semanas de idade. Esse protocolo foi baseado na teoria do crescimento seletivo utilizando a supressão do crescimento de células normais através de um agente químico hepatotóxico e a estimulação regenerativa forçada de células hepáticas resistentes a hepatotoxina e iniciadas pelo carcinogênico (ITO, *et al.*, 2003).

Baseados nesse conceito Ito *et al.* (1988) estabeleceram gradualmente um novo modelo de hepatocarcinogênese química que pode ser detectada pela medida de focos de células alteradas no fígado, através de técnicas de imunohistoquímica. A glutathione S-transferase forma placentar (GST-P) é um ótimo marcador imunohistoquímico para a visualização clara de LPN (LÖW-BASELLI, *et al.* 2000).

2.5 Alquilação do DNA e Mutagenicidade Induzidos por DEN

O mecanismo pelo qual a DEN forma adutos de DNA é apresentado na figura 2. O primeiro evento é a bioativação resultante da ação das enzimas de fase I (CYP-P450). Essas enzimas mediam uma α -hidroxilação, produzindo uma α -hidroxinitrosamina. A principal enzima ativadora no fígado é a CYP2E1, porém outras isoenzimas P450 são encontradas como bioativadoras, tais como as CYPs 2A3 e 2A6.

Figura 2: Biotransformação da DEN e mecanismo de formação de adutos de DNA. Adaptado de VERNA *et al.* (1996).

O mecanismo de alquilação é relativamente rápido e simples. A DEN pode produzir adutos em qualquer órgão que possua as isoenzimas P450 apropriadas. O sistema que melhor explica a ativação da DEN e a formação de adutos foi realizado *in vitro*, utilizando CYPs P450 de porcos. Os autores observaram que a ativação foi dependente da presença combinada de oxigênio molecular, de enzimas P450 e NADPH redutase e de bases de DNA. Quando qualquer um destes componentes foi retirado, a ativação diminuiu drasticamente (VERNA *et al.*, 1996).

2.6 Enzimas Metabolizadoras de Xenobióticos

As substâncias xenobióticas ao organismo são transformadas por enzimas, chamadas de metabolizadoras de xenobióticos de fase I (oxidação, redução e hidrólise) e fase II [conjugação com o ácido glucurônico, sulfatação, acetilação, metilação e conjugação com a glutatona (GSH)]. Existe um grande número de enzimas com papéis específicos na remoção de tóxicos que ameaçam o funcionamento normal do organismo.

As enzimas de fase I são responsáveis, geralmente, pela ativação metabólica de carcinogênicos indiretos. Dentre estas enzimas podem-se destacar as citocromo P-450 (CYP-450), que convertem pró-carcinogênicos inócuos em intermediários eletrofílicos quimicamente reativos, os quais podem seguir dois caminhos. Um deles é se ligar covalentemente a bases susceptíveis do DNA celular, o que pode acarretar o início de um processo carcinogênico. O outro caminho é serem destoxificados via ação de enzimas de fase II que os tornam mais hidrofílicos, e conseqüentemente passíveis de excreção. A figura 3 mostra esquematicamente um resumo da ação dessas enzimas (TALALAY & FAHEY, 2001).

Figura 3: Representação esquemática da ativação e destoxificação de carcinogênicos. GST – Glutathione S-Transferase, UGT – UDP-glucuronosil transferase, EROs – Espécies Reativas de Oxigênio. Adaptado de Talalay e Fahey (2001).

O balanço fisiológico entre essas enzimas, incluindo seus níveis de expressão e polimorfismos podem ser determinantes na sensibilidade ou no risco de um indivíduo desenvolver câncer, quando exposto a carcinógenos. (CHEN & KONG, 2005).

2.7 Oxidação do DNA e Formação da 8-OHdG

Muitas pesquisas dão suporte à idéia de que as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e as EROs representam papel importante no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, incluindo o câncer. Com isso aumenta o interesse na hipótese de que antioxidantes podem prevenir ou reduzir o risco do desenvolvimento de alguns tipos de câncer.

ERNs ou EROs, quando não eliminadas pelo sistema antioxidante celular, reagem e danificam biomoléculas celulares. Quando esses danos ocorrem em DNA podem exercer influenciar em diversos fenômenos biológicos incluindo carcinogênese (PARK *et al*, 2005), mutação e inflamação (ICHIBA *et al*, 2003).

EROs e ERNs possuem muitas características carcinogênicas. A mutagênese induzida por ambas pode contribuir para as etapas de iniciação, promoção e progressão do câncer. Por exemplo, EROs/ ERNs podem exercer os seguintes efeitos:

- 1- Causar alterações na estrutura do DNA, como mutações em pares de bases, rearranjos, deleções, inserções, amplificação de seqüências. EROs podem produzir grandes alterações cromossomais e conseqüentemente, mutações pontuais, levando a inativação de genes supressores de tumor, ou a ativação de um proto-oncogene. Isso pode ocorrer durante as fases de promoção e progressão da neoplasia, levando a expressão do fenótipo mutado;

2- Afetar as vias de transdução do sinal no citoplasma e no núcleo. Por exemplo, H_2O_2 pode levar ao deslocamento de subunidades inibitórias do fator nuclear de transcrição citoplasmático κB , permitindo que o fator ativado migre para o núcleo;

3- Modular a atividade de proteínas e genes que respondem ao estresse e daquelas que agem regulando os genes relacionados com a proliferação, diferenciação e apoptose celular (WILSEMAN & HALLIWELL, 1996).

Danos em DNA causados por EROs podem promover múltiplas lesões incluindo “quebras” em fita simples ou fita dupla de DNA. EROs estão envolvidas em inúmeras condições patológicas como inflamação e câncer. Descreve-se que as EROs estão envolvidas na doença crônica do fígado e na etiologia do hepatocarcinoma.

Estudos sobre os mecanismos de desenvolvimento de neoplasias sugerem um possível envolvimento entre danos oxidativos em DNA e a carcinogênese. A oxidação do DNA pode resultar em danos em todas as quatro bases e na desoxirribose. Um dos produtos mais abundantes dessa oxidação e de fácil detecção é a 8-hidroxideoxi-2-guanosina (8-OHdG), que quando presente em DNA celular pode causar mutagênese e conseqüente carcinogênese. A sua formação reflete os danos oxidativos sofridos pelo DNA e está entre as mais de 20 modificações que podem ser formadas sob condições de estresse oxidativo (NAKAE, *et al.*, 1997).

A aplicação de carcinógenos resulta na formação de adutos de DNA, que podem ser identificados por biomarcadores, como é o caso da 8-OHdG, detectada em vários tecidos e em leucócitos (IRIE *et al.*, 2005). Essa base foi descrita pela primeira vez por Kasai e Nishimura em 1984, desde então a 8-OHdG é amplamente utilizada como biomarcador para danos oxidativos (LEE *et al.*, 1998).

Nakae (1997) observou uma relação entre baixas doses de DEN e a formação de 8-OHdG. Verificou também que o pico de excreção urinária dessa base modificada ocorreu 24h após a aplicação da DEN.

A formação de 8-OHdG é a maior causa de mutações espontâneas em DNA e pode contribuir para a carcinogênese e para o envelhecimento. Este dano é considerado promutagênico e causa um tipo específico de mutação, a transverso de Guanina:Citosina (G:C) para Timina:Adenina (T:A) que é intimamente ligada a carcinogênese (ICHIBA, *et al.*, 2003)

Humanos que foram submetidos a um consumo elevado de frutas e de hortaliças, apresentaram redução dos níveis de 8-OHdG na urina e em linfócitos, o que sugere que o consumo desses alimentos reduz a incidência de formação de danos e conseqüentemente diminui o risco de neoplasias (THOMPSON, *et al.*, 1999).

Recentemente Ichiba *et al.* (2003) encontraram níveis elevados de 8-OHdG em tecido hepático de pacientes com hepatocarcinoma quando comparados a pacientes saudáveis. Estes achados são muito interessantes e demonstram que a 8-OHdG pode ser utilizada como um biomarcador para detectar precocemente danos em DNA hepático.

Algumas vezes danos em DNA são analisados a partir da quantificação de bases modificadas excretadas na urina. Muitos produtos de danos em bases de DNA são excretados por essa via, entretanto, um dos mais explorados é a 8-OHdG. Alternativamente, pode-se medir a 8-hidroxi guanina (8-OHG), porém ela pode ser influenciada se a dieta consumida apresentar essa base, e também por danos oxidativos em RNA. Em contraste, a 8-OHdG encontrada na urina não pode ser afetada pela dieta visto que os nucleosídeos não são absorvidos pelo intestino.

A 8-OHG e a 8-OHdG também são os produtos medidos com maior frequência em isolados de DNA como indicador de danos oxidativos. Essas

formas podem ser extraídas do DNA por hidrólise ácida ou hidrólise enzimática, sendo a última a mais eficiente (PARK *et al.*, 2005).

A 8-OHdG pode ser detectada e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção eletroquímica. Uma alternativa é a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS), que pode medir o espectro modificado (oxidado, metilado, desaminado etc.) de bases de DNA. Ambos os métodos são suficientemente sensíveis para medir o nível dos danos em estado fixo de bases de DNA. Porém, a CLAE pode subestimar a quantidade de 8-OHdG em DNA proveniente de uma hidrólise enzimática não eficiente (LOFT & POULSEN, 1998).

Esses métodos além de trabalhosos necessitam de equipamentos e de muito tempo e não asseguram a identificação precisa da 8-OHdG da amostra. Com o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal específico para a 8-OHdG foi possível a padronização do método de ELISA. Hoje o kit necessário para a aplicação desse método é disponível comercialmente (JalCA-Japão).

Essa técnica foi utilizada por alguns estudos mostrando sua confiabilidade (TOYOKUNI, *et al.*, 1997; MIZUSHIMA, *et al.*, 2001). Consequentemente a detecção de 8-OHdG por ELISA é considerada um método sensível para medir danos oxidativos em DNA. Esse método é superior a CLAE em alguns aspectos: não necessita de equipamentos caros, exceto um leitor de ELISA e o tempo de análise é reduzido além de requerer pequena quantidade de amostra.

2.1 Alimentação, Nutrição e Câncer

Resultados de estudos epidemiológicos indicam que o alto consumo de frutas e hortaliças e a adoção de um estilo de vida saudável estão associados à baixa incidência de neoplasias. Pesquisadores afirmam ainda

que aproximadamente um terço de todos os cânceres humanos está relacionado à dieta (LEE & PARK, 2003). Tanaka (1997), sugere que o potencial de prevenção de todos os cânceres seria efetivamente de 80 a 90%, e ainda que o fator alimentação responderia por 40% de todos os casos da doença em homens e por 60% destes em mulheres. As causas alimentares do câncer incluiriam, em geral, hiperalimentação, consumo reduzido de frutas e hortaliças, bem como o consumo excessivo de gorduras e carnes.

Durante as décadas de 1960 e 1970, epidemiologistas investigaram os padrões de incidência de cânceres na população relacionando-os com a distribuição demográfica e socioeconômica, com os efeitos da migração e com os hábitos alimentares em diferentes grupos, possibilitando a conclusão de que fatores nutricionais desempenham, efetivamente, importante papel na etiologia e na prevenção de cânceres (DOLL e PETO, 1981).

A observação de que a incidência de certos tipos de câncer é elevada em algumas regiões pode direcionar conclusões a respeito da dieta. Por exemplo, o consumo aumentado de alimentos que contêm substâncias genotóxicas e aminas heterocíclicas, as quais podem ser formadas durante o preparo de carnes, promove danos em DNA celular (formação de adutos) e conseqüentemente um aumento da incidência de neoplasias. Em contrapartida, uma população que utiliza dietas com fartura de frutas e de hortaliças (com altos teores de CBAs), pode aumentar a capacidade do organismo de destoxificar essas substâncias, prevenindo a formação de adutos de DNA, e, por conseqüência, apresenta menor incidência de cânceres (KAPISZEWSKA, 2006).

O mecanismo pelo qual frutas e hortaliças promovem a saúde ainda não foi totalmente elucidado. A alta ingestão destes alimentos ajuda a modificar todo o padrão nutricional da dieta, pelo aumento do consumo de fibras e pela redução da ingestão de gorduras e de açúcares simples, o que conseqüentemente contribui para a redução do peso corporal. Isto pode

ajudar a reduzir, por exemplo, a incidência de cânceres de mama e do trato gastrointestinal (KEARNEY *et al.*, 2005).

Além disso, as frutas e hortaliças apresentam outras características benéficas à saúde humana, tais como a presença de vitaminas e de minerais, importantes para as defesas antioxidantes, e dos CBAs como, por exemplo, os compostos fenólicos, os glicosinolatos e os carotenóides (KEARNEY *et al.*, 2005).

Os CBAs são capazes de induzir e modular uma variedade de funções fisiológicas, incluindo ações antioxidantes diretas e indiretas, redução de danos em DNA, regulação de enzimas metabolizadoras de xenobióticos (de fase I e II), controle do metabolismo hormonal, apoptose e controle do ciclo celular. Todas estas ações estão relacionadas à redução do risco do desenvolvimento de câncer (FINLEY, 2005).

A hipótese de que a dieta é o primeiro fator relacionado ao risco de desenvolvimento do câncer direcionou a atenção de muitos pesquisadores para um possível papel quimiopreventivo, ou seja, de uma provável redução do risco de desenvolvimento do câncer, mediado por CBAs. Neste sentido Yuan *et al.* (2006) em estudo clínico estabeleceram uma relação inversa entre os níveis séricos de retinol e o risco do desenvolvimento do hepatocarcinoma celular. Os autores atribuem esse efeito a capacidade do retinol e de seus derivados (retinóides) de promover a diferenciação celular e de reduzir a resposta inflamatória.

Em experimento *in vitro*, o espinafre, o repolho, a pimenta vermelha, a cebola e o brócolos apresentaram uma potente atividade inibitória do crescimento de células de câncer hepático (HepG₂) de maneira dose-dependente. Contudo, os autores não encontraram correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos e a inibição da proliferação de células neoplásicas. Isso sugere que os efeitos antiproliferativos não estão

relacionados a um único CBA, mas a todos os componentes do alimento (CHU *et al.*, 2002).

O alho promoveu redução no número e na área de lesões pré-neoplásicas (LPN) hepáticas, em modelo de hepatocarcinogênese em ratos. Os animais foram suplementados via gavagem (20mg/kg p.c.) diariamente durante 10 semanas. Os autores atribuíram esse efeito protetor a um aumento da destoxificação do carcinógeno, por meio do aumento da expressão de enzimas de fase II (SAMARANAYAKE *et al.*, 2000).

Contudo, alguns autores ainda questionam os efeitos quimiopreventivo das frutas e das hortaliças. Moller *et al.* (2003) utilizaram três grupos de voluntários saudáveis e não fumantes. O primeiro grupo consumiu diariamente 600g de frutas e hortaliças, incluindo maçã, pêra, suco de laranja, brócolos, cenoura, cebola e tomate. O segundo grupo ingeriu comprimidos de vitaminas com a mesma quantidade de antioxidantes e minerais e o último grupo recebeu comprimidos sem antioxidantes (placebo). Os diferentes tratamentos não alteraram os níveis de danos de “quebra” em DNA e também não reduziram os danos oxidativos a bases de DNA.

Nesse sentido, Finley (2005) apresentou dados sobre as controvérsias a respeito do assunto. O autor concluiu que a metodologia utilizada nos estudos epidemiológicos pode ser decisiva. Geralmente os estudos de caso/controle encontram associação inversa entre o consumo de frutas e hortaliças e a incidência e mortalidade por câncer, entretanto, a maioria dos estudos de coorte não apresentam evidências convincentes de que o consumo elevado de frutas e hortaliças reduz o risco do desenvolvimento de câncer. O autor afirma que “são consistentes, porém não universais” as evidências para a afirmação de efeitos quimiopreventivos de frutas e hortaliças.

2.2 Quimioprevenção do Câncer por Hortaliças Brassicas

Um grupo de hortaliças que tem efeito potencial contra o câncer é o das hortaliças da família das crucíferas, principalmente do gênero *Brassica* espécie *oleracea*, como o brócolos, a couve-flor, o repolho, a couve, a couve de Bruxelas (STOEWSAND, 1995). Dados epidemiológicos sugerem que uma dieta com altas quantidades de hortaliças *Brassicas* pode reduzir o risco de vários tipos de câncer. O entendimento dos mecanismos que promovem essa redução ainda não são totalmente claros (KUSHAD *et al.*, 1999).

Em humanos, uma dieta com altos teores de couve de Bruxelas resultou na redução de danos no DNA, observados pela redução da excreção urinária de adutos de DNA (VERHAGEN, *et al.*, 1995). A utilização de um extrato aquoso também de couve de Buxelas apresentou efeito similar em ratos e inibiu a oxidação do DNA em linfócitos humanos isolados (ZHU & LOFT, 2001).

Jain *et al.* (1999) e Kolonel *et al.* (2000) observaram uma importante redução no risco de câncer de próstata relacionado com o aumento da ingestão de hortaliças *Brassicas*. Terry *et al.* (2001) observaram redução no risco do desenvolvimento de câncer de mama em mulheres com consumo freqüente de hortaliças crucíferas e Zhang *et al.* (2000) associaram o consumo dessas hortaliças com a redução de linfomas em mulheres.

Yuan *et al.*, (1998) relataram menor incidência de carcinoma celular renal em animais tratados com *Brassicas*. Ainda, existem também estudos relacionando essas hortaliças com vários outros tipos de câncer como o de bexiga, de cólon, de reto e de pulmão (MICHAUD *et al.*, 1999; COHEN *et al.*, 2000).

Hortaliças da família das *Brassicas* apresentaram efeito protetor contra lesões pré-neoplásicas (LPN) de fígado e de cólon, induzidas em ratos Fischer 344 pela amina heterocíclica 2-amino-3-methylimidazo [4,5-*f*]

quinolina (IQ). Os animais receberam sucos de repolho roxo e de couve de Bruxelas na água de beber, antes e durante o tratamento com o carcinogênico. Os pesquisadores observaram inibição de LPN, sugerindo que o consumo de destas hortaliças pode proteger seres humanos contra o risco representado pelas aminas heterocíclicas (KASSIE, *et al*, 2003).

Contudo Uhl e colaboradores (2004) em experimento semelhante ao anterior, porém tratando os animais apenas após a aplicação do carcinogênico, não observaram efeitos.

As hortaliças *Brassic*as demonstram uma proteção eficiente contra doenças neoplásicas por apresentarem a capacidade de modular a atividade e a expressão de enzimas de biotransformação de fase II, como por exemplo a glutathione S-transferase (GST) e a UDP-glucuronosil transferase (VERHOEVEN, 1997). Estas enzimas têm um importante papel na regulação da toxicidade, da mutagenicidade e dos efeitos neoplásicos de carcinogênicos químicos, uma vez que elas são responsáveis pela destoxificação celular. Essa modulação é atribuída aos CBAs presentes nessas plantas, especialmente os glicosinolatos (LAMPE, 2003).

Hortaliças *Brassic*as constituem principal fonte alimentar de glicosinolatos, característica que as distingue de outras hortaliças (KUSHAD *et al*, 2004). Em anos recentes, as propriedades quimiopreventivas dessas hortaliças foram atribuídas ao conteúdo de glicosinolatos e especialmente aos seus produtos de degradação, como os isotiocianatos (ITC) e os indóis (CANISTRO *et al.*, 2004).

Mais de uma centena de glicosinolatos foram identificados, com presença predominante, mas não exclusiva, nos vegetais da família das crucíferas (DAS *et al.*, 2000). O conteúdo de glicosinolatos nas plantas depende de várias características, como variedade, condições de cultivo, clima e fatores agrônômicos associados ao crescimento da planta. Os níveis ainda variam de acordo com a parte da planta analisada (VERKERK, 1997;

DAS *et al.*, 2000). Informações detalhadas sobre o consumo de *Brassicac*s ainda não estão disponíveis e muito pouco se sabe sobre a recomendação da ingestão de glicosinolatos, porém, uma porção de 12-16 mg por dia é sugerida (FENWICK & HEANY 1983).

Em meados de 1960 surgiu o interesse de que certos compostos aromáticos e indóis, bem como produtos da hidrólise de glicosinolatos, pudessem influenciar a carcinogênese. Diversos estudos avaliaram o potencial anticarcinogênico das hortaliças *Brassicac*s e sugeriram uma relação com os produtos de hidrólise dos glicosinolatos, especialmente os ITC (ZHANG *et al.*, 1992; BARCELO *et al.*, 1996; ZHU e LOFT, 2003). Nesse sentido, Nishikawa *et al.* (2003) descreveram atividade quimioprotetiva eficiente do 6-fenilhexil ITC contra câncer de bexiga.

Em uma revisão completa sobre ITC e quimioprevenção de câncer, encontram-se dados interessantes, especialmente em humanos. O autor cita três trabalhos onde houve redução do risco relativo do desenvolvimento de câncer de pulmão em pacientes com alta excreção urinária de ITC, entretanto, essa redução foi observada apenas em pacientes não fumantes. O resultado de outro estudo citado revelou baixos níveis de excreção urinária de ITC em pacientes com câncer de mama em comparação a pacientes saudáveis, sugerindo que um consumo aumentado de ITCs dietéticos pode reduzir o risco do desenvolvimento desta neoplasia. E pacientes com câncer de cólon apresentaram consumo reduzido de hortaliças *Brassicac*s, avaliado por questionário alimentar (ZHANG, 2004).

Smith *et al.* (1998) observaram que a administração do ITC sinigrina induziu a apoptose e reduziu significativamente o número de focos de criptas aberrantes em cólon de ratos Wistar, o que indica efeitos quimiopreventivos.

Muitos mecanismos são propostos para a atividade quimiopreventiva dos produtos de degradação dos glicosinolatos. Smith *et al.* (1996) demonstraram que o fenil ITC inibiu a atividade de enzimas relacionadas a

ativação de carcinógenos. Outra hipótese é que uma dieta com altos teores de glicosinolatos aumenta a atividade de enzimas de destoxificação de fase II, como a quinona redutase (QR), e a GST. Nijhoff *et al.* (1995) relataram que o consumo de couve de Bruxelas cozida protegeu contra câncer colo-retal quimicamente induzido em ratos e aumentou a síntese de GST.

Em comparação ao número de estudos que utilizam indóis e ITC, são poucos que usam as hortaliças *Brassic*as. Os efeitos anticarcinogênicos quando avaliados em compostos isolados podem ser diferentes em relação aos que utilizam as hortaliças, principalmente pela possível ocorrência de interações entre os componentes das plantas (VERHOEVEN *et al.*, 1997; TALALAY & FAHEY, 2001).

Dentre os efeitos das hortaliças *Brassic*as e dos indóis observados em humanos podem-se citar a redução de danos oxidativos no DNA, o aumento da atividade da GST e a indução da estradiol 2-hidroxilase (enzimas de fase II) (CANISTRO *et al.*, 2004). Isotiocianatos, indóis e *Brassic*as reduzem a formação de neoplasias em tecidos e em sistemas de teste de vários carcinogênicos.

Entretanto as hortaliças *Brassic*as apresentam outros CBAs, como compostos fenólicos e carotenóides, que apresentam atividades biológicas. Dentre os carotenóides cabe destacar a luteína, que possui importante capacidade antioxidante (DWYER *et al.*, 2001) e ocorre em altas quantidades na couve (KRUK, 2005). Esse carotenóide apresentou efeitos quimiopreventivos no modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente” em ratos tratados via gavagem. Dentre os resultados observaram-se redução de LPN e inibição de danos em DNA, sugerindo potencial capacidade antioxidante da luteína (TOLEDO, *et al.* 2003; MORENO, *et al.*, 2007)

Existe uma correlação inversa entre as concentrações plasmáticas de carotenóides, incluindo a luteína e o risco do desenvolvimento de câncer de

mama em mulheres. Esse efeito pode estar relacionado à capacidade antioxidante dos carotenóides (TAMIMI *et al.*, 2005).

Em humanos, a luteína apresentou redução da incidência de câncer de cólon em pacientes que consumiram alimentos com esse carotenóide. Os autores sugerem que esse efeito pode ser devido a sua capacidade antioxidante relacionada à efetividade bioquímica de seqüestrar espécies reativas de oxigênio, bem como com a sua capacidade de reagir com as membranas celulares do cólon, susceptíveis a carcinogênese (SLATERRY *et al.*, 2000).

2.8 Nutrigenômica

Os termos genômica nutricional ou nutrigenômica caracterizam uma nova visão do estudo de alimentos e da pesquisa nutricional na qual a avançada tecnologia funcional genômica é utilizada, ao lado de técnicas nutricionais e bioquímicas para determinar os mecanismos pelos quais os alimentos e seus componentes individuais modulam processos que ocorrem nos tecidos do organismo humano (OLIVEIRA & MARCHINI, 2004).

A nutrigenômica procura o entendimento genético pelo qual os CBAs presentes na dieta afetam o balanço entre a saúde e a doença, por alterar a função e/ou a estrutura do mapa genético individual. Ou seja, é a interface entre o ambiente nutricional e os processos celular e genético. As bases conceituais para essa nova área do conhecimento podem ser resumidas em:

1 – CBAs, quando consumido na dieta habitual, atuam no genoma humano, direta ou indiretamente por alterar a expressão ou a estrutura gênica;

2 – Sob certas circunstâncias e em alguns indivíduos, a dieta pode ser um sério fator de risco para muitas doenças, como o câncer e as doenças cardiovasculares;

3 – Alguns genes regulados pela dieta apresentam papel importante na incidência, na progressão ou na gravidade de doenças crônicas;

4 – A intensidade com que a dieta afeta o equilíbrio entre os estados de saúde e de doença pode depender do mapeamento genético individual;

5 – Intervenções dietéticas baseadas nas necessidades nutricionais, no estado nutricional e no genótipo (por exemplo, nutrição individualizada) podem ser utilizadas para prevenir, amenizar ou curar doenças crônicas (KAPUT & RODRIGUEZ, 2004).

Os CBAs podem alterar a expressão gênica direta ou indiretamente. Em nível celular os nutrientes podem: atuar como ligantes para fatores de transcrição, ser metabolizados e alterar a concentração de substratos intermediários, ou alterar as vias sinalizadoras positiva ou negativamente.

Dessa forma as novas tecnologias que permitem o estudo de polimorfismos (genômica - DNA), do processo de transcrição gênica (transcriptômica - RNA), da tradução de proteínas (proteômica) e da produção de metabólitos (metabolômica), permitem o estabelecimento da interação gene-nutriente. Estas informações prometem revolucionar os conceitos de dieta e de promoção da saúde (OLIVEIRA & MARCHINI, 2004).

Com relação ao câncer, sabe-se que muitos nutrientes e CBAs podem influenciar a expressão de determinados genes. Um exemplo são os ITC, que apresentaram capacidade de aumentar a expressão de genes relacionados a enzimas de destoxificação como a quinona redutase e a GST (TALALAY & FAHEY, 2001). Esse efeito ajuda o organismo a eliminar com maior rapidez compostos carcinogênicos, reduzindo os danos causados por esses compostos a biomoléculas como o DNA, conseqüentemente isso reduz o risco do desenvolvimento de câncer.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

➤ Avaliar a eventual atividade quimiopreventiva das hortaliças *brassicas* couve e repolho na hepatocarcinogênese química.

3.2 Objetivos Específicos

➤ Avaliar se há atividade quimiopreventiva das hortaliças *brassicas* couve e repolho em ratos Wistar submetidos ao modelo experimental de hepatocarcinogênese de “Ito”, via redução de LPN hepáticas;

➤ Avaliar se as hortaliças couve e repolho induzem apoptose em LPN hepáticas;

➤ Analisar os efeitos das hortaliças *brassicas* couve e repolho em danos em DNA hepático;

➤ Avaliar o efeito das hortaliças couve e repolho na formação de bases modificadas de DNA (8-OHdG);

➤ Analisar a influência das hortaliças couve e repolho na expressão diferencial de genes em fígado e cólon de ratos iniciados com DEN.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para atingir os objetivos anteriormente propostos e responder as perguntas subseqüentes, foram utilizados dois protocolos experimentais, onde o primeiro referiu-se a um modelo experimental de hepatocarcinogênese, e o segundo a um ensaio de aplicação do carcinogênico DEN.

O primeiro ensaio teve como objetivo a avaliação dos efeitos das hortaliças em pontos críticos da carcinogênese hepática, como lesões pré-neoplásicas, apoptose e danos em DNA.

O segundo ensaio teve como finalidade observar os efeitos das hortaliças no metabolismo do carcinógeno e em etapas críticas para o início da neoplasia, tais como danos em DNA, formação de adutos e modulação da expressão gênica.

Os ensaios e as respectivas técnicas utilizadas em cada experimento estão descritas a seguir.

4.1 Protocolo Experimental I - Modelo de Hepatocarcinogênese

4.1.1 Preparo do Suco

As hortaliças couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) e repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) foram adquiridas em supermercado local, aproximadamente três vezes por semana e conservadas em geladeira (4°C). Os sucos foram preparados todos os dias, com as hortaliças cruas. Após serem lavadas, as hortaliças foram cortadas em pedaços menores e adicionadas a água de beber na concentração de 10% (p/v). As hortaliças foram separadamente adicionadas à água com o auxílio de um liquidificador doméstico (Walita - LiqArt) que apresenta um filtro acoplado, onde as partículas maiores ficaram retidas. Esse procedimento foi realizado de acordo

com Kassie *et al.* (2003), que avaliou os efeitos quimiopreventivos, na concentração de 5%, da couve de Bruxelas e do repolho roxo na carcinogênese de fígado e de cólon, ambas induzidas por IQ. Por ser a DEN um carcinógeno mais potente que a IQ, optou-se por fornecer o dobro da concentração (10%) das hortaliças couve e repolho no experimento.

A dose de 10% foi testada em estudos prévios que incluíram a avaliação da sedimentação das hortaliças quando adicionadas à água na concentração de 5, 10 e 15%, e a aceitação de animais, em estudo piloto durante 10 dias.

4.1.2 Animais

Os animais utilizados neste estudo foram ratos machos albinos da linhagem Wistar, recém desmamados, obtidos da colônia do biotério de experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Estes permaneceram durante todo o experimento em sala apropriada para estudos de carcinogênese nas seguintes condições: temperatura de 22°C ($\pm$ 2°C) e umidade do ambiente (55%), com ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (no máximo 4 ratos/gaiola) com tampas de aço inoxidável e contendo maravalha previamente esterilizada, trocada em dias alternados. Os ratos receberam “*ad libitum*”, durante todo o experimento, ração comercial peletizada para roedores de laboratório (Purina Nutrimentos Ltda., Brasil) e água destilada adicionada ou não das hortaliças couve ou repolho (10% p/v). Foi realizado controle diário de peso e do consumo de ração e de líquido.

4.1.3 Modelo de Hepatocarcinogênese de Ito

Para a realização deste estudo utilizou-se o modelo de hepatocarcinogênese de “Ito” descrito e utilizado na literatura por vários autores (IMAIADA *et al.*, 1981; ITO *et al.*, 1988; 1997; 2000; 2003; HASEGAWA *et al.*, 1992; PINHEIRO *et al.*, 2003; BARBISAN *et al.*, 2003; SAMARANAYAKE *et al.*, 2000).

O modelo consiste na iniciação dos animais com a aplicação intraperitoneal de uma dose única e necrogênica (200 mg/kg de peso corporal [p.c.]) do agente iniciante dietilnitrosamina (DEN; Sigma, EUA) dissolvido em solução de NaCl 0,9%. Ao final de 3 semanas após a iniciação, os animais foram submetidos a um potente estímulo mitogênico, representado por uma hepatectomia parcial (HP) a 70%, realizada de acordo com a metodologia de Higgins e Anderson, (1931). Os animais foram sacrificados na oitava semana (ITO *et al.*, 1988).

A HP é utilizada por ser um eficiente estímulo proliferativo, no qual uma semana após o procedimento cirúrgico o fígado já retornou ao seu peso pré-operatório, com o pico da síntese de DNA ocorrendo 24 horas após a cirurgia. Esse modelo é internacionalmente recomendado para testes de quimioprevenção (ITO *et al.*, 2003).

4.1.4 Protocolo Experimental I

Para a investigação dos potenciais efeitos quimiopreventivos do repolho e da couve em ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de “Ito”, bem como para a verificação dos possíveis mecanismos que podem estar relacionados à quimioprevenção, foram utilizados animais experimentais e protocolos adequados com objetivo de modular ou interromper o processo carcinogênico.

Após um período de aclimação de 7 dias, com exceção de 8 animais que constituíram um grupo controle a parte de ratos considerados “Normais” (**N**), e que não foram submetidos a qualquer procedimento experimental durante todo o estudo, mas apenas permaneceram nas mesmas dependências que os outros grupos experimentais, 45 animais foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de “Ito” (ITO *et al.*, 1988).

Assim esses 45 animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos diferentes, cada um com 15 animais, a saber:

Grupo água (A): os animais deste grupo receberam apenas água destilada e foram submetidos ao modelo de “Ito”. Este grupo foi utilizado como grupo controle (Figura 4).

Grupo couve (C): os animais deste grupo receberam diariamente na água (destilada) de beber, 10% de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*), por 8 semanas consecutivas até o dia da eutanásia. Decorridas duas semanas do início da oferta da couve na água, os animais deste grupo foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de “Ito” (Figura 4).

Grupo repolho (R): os animais deste grupo receberam diariamente na água (destilada) de beber 10% de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) por 8 semanas consecutivas até o dia da eutanásia. Após duas semanas do início da oferta de repolho na água, os animais foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de “Ito” (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática do protocolo experimental para a avaliação das eventuais atividades quimiopreventivas do repolho e da couve quando administrados durante 8 semanas consecutivas e em período abrangendo as etapas de iniciação e promoção do desenvolvimento neoplásico hepático.

4.1.5 Eutanásia

Antes de serem eutanasiados, todos os animais foram pesados em balança eletrônica. Em seguida os mesmos foram anestesiados com éter (Merck, Brasil). Após o início da anestesia os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre uma prancha, com inalação contínua de éter, realizando-se a seguir, a laparotomia. A eutanásia ocorreu pela secção da aorta abdominal e conseqüente choque hipovolêmico. Em seguida retirou-se o fígado, que foi lavado em solução fisiológica (4^oC) e pesado em balança eletrônica digital.

Posteriormente foram coletadas, de cada animal, amostras dos lóbulos hepáticos direito, triangular e caudado esquerdo para análise morfométrica de LPN GST-P positivas e para avaliação da apoptose. Esses fragmentos foram imediatamente fixados em solução Carnoy (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial, Merck, Brasil). Após aproximadamente 24 h, os fragmentos foram transferidos para uma solução de álcool 70%, seguindo-se as técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. A partir desse material foram obtidos cortes histológicos de aproximadamente 5 µm de espessura para realização de análises posteriores. Também foram colhidas amostras hepáticas de todos os lobos que foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -80°C, para análises posteriores.

4.1.6 Análise Morfométrica das LPN GST-P Positivas

Para avaliar as eventuais atividades quimiopreventivas das hortaliças couve e repolho, em ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de "Ito", utilizou-se como ferramenta a análise morfométrica das LPN em cortes histológicos hepáticos submetidos à reação imunoistoquímica para GST-P.

4.1.6.1 Marcação Imunoistoquímica para GST-P

O método utilizado para a realização da marcação imunoistoquímica da GST-P foi o da avidina-biotina (HSU *et al.*, 1981), empregando-se, para tanto, anticorpo policlonal anti-GST-P (MBL, Japão) e anticorpos secundários biotinilados anti-imunoglobulinas de coelho (Vector Laboratories, EUA). Estes últimos consistem em anticorpos anti-IgG conjugados à biotina.

Cada procedimento foi intercalado por lavagem das lâminas com solução salina tamponada com fosfato (PBS – NaCl, KCl, Na₂HPO₄ – e água ultra pura).

Antes desse procedimento, os cortes histológicos dos fígados foram desparafinizados em xilol em seqüência de xilol/álcool (1:1), etanol absoluto, depois em etanol 95%, etanol 70% e, finalmente, em água destilada.

A peroxidase endógena foi bloqueada com metanol contendo 20% de peróxido de hidrogênio a 30 volumes (Merck, Brasil), durante 30 min. Os cortes foram então incubados com o anticorpo primário anti GST-P na diluição de 1:1000, durante uma noite e a 4°C em câmara úmida. Para diluir o anticorpo primário, foi utilizada solução contendo soro-albumina a 0,5% (albumina bovina fração V; Sigma, EUA) em água destilada, azida sódica a 5% e PBS.

No dia seguinte, os corte foram incubados por 30 minutos com o anticorpo secundário biotinilado, na diluição de 1:400. A aplicação do conjugado avidina-biotina-peroxidase (Vectastain-ABC kit, Vector EUA) diluído em PBS (1:400) decorreu também por 30 minutos.

Posteriormente, foi aplicada sobre os cortes uma solução substrato de peroxidase preparada imediatamente antes da utilização.

Essa solução constitui na mistura de peróxido de hidrogênio a 0,02% (Merck, Brasil) com diaminobenzidina DAB (Sigma, EUA) a 0,1% em PBS.

Os cortes foram então lavados em PBS por 5 min., contracorados pela eosina e em seguida corados pela hematoxilina, desidratados, diafanizados e montados com resina sintética.

4.1.6.2 Procedimento para Quantificação de LPN GST-P Positivas

Para quantificar o número e a área das LPN GST-P positivas foi utilizado o sistema de análise de imagens computadorizado do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Este é composto por um microscópio (Olympus, Japão) ao qual está acoplada uma câmera de vídeo (Sony, Japão) que se conecta a um microcomputador, equipado com o programa de imagem Pro Plus (Media Cybernetics). As lâminas foram observadas em objetiva de 10x, as áreas de interesse foram delimitadas com um cursor, e o programa forneceu suas dimensões em mm². Ao final destes procedimentos obtiveram-se os seguintes parâmetros:

- Número de lesões pré-neoplásicas (LPN) GST-P positivas por cm²;
- Área agregada de LPN GST-P positivas (mm²/cm² de área do corte);

4.1.7 Quantificação de Corpúsculos Apoptóticos (CA) Hepáticos

Nos mesmos cortes submetidos à imunoistoquímica para GST-P foi realizada a contagem do número de CA por mm² de área de LPN ou de área sem alterações morfológicas ao redor das mesmas (*surrounding*). Para isso

utilizou-se a técnica de microscopia de fluorescência, descrita por Stinchcombe *et al* (1995) e por Ong *et al.* (2006). Esta se baseia no princípio de que, quando submetidos à luz azul (450-490 nm) os CA corados por eosina apresentam intensa fluorescência. O microscópio utilizado apresentava unidade de epifluorescência (Nikon, Japão; Laboratório de Imunologia Clínica da FCF-USP). Analisou-se a área total dos cortes utilizando-se objetiva de 40x, e à medida que os corpúsculos fluorescentes eram localizados, alternava-se o sistema para luz transmitida normal, e suas identidades eram então confirmadas de acordo com critérios morfológicos clássicos descritos na literatura (GRASL-KRAUPP *et al.*, 1994). Os resultados foram expressos como número de CA/mm² de área de LPN ou área de tecido sem alterações morfológicas ao redor da mesma.

4.1.8 Análise de Danos em DNA Hepático Tratado *ex vivo* com H₂O₂

Amostras de fígado de ratos submetidos ao protocolo experimental I, e previamente estocadas em freezer a -80°C foram submetidas à técnica do “cometa” alcalino (HARTMANN *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2005).

Essa técnica consiste em homogeneização delicada do tecido hepático em tampão PBS (2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂PO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 0.14 M NaCl; pH 8.0), com o auxílio de um *dounce* e sob refrigeração. Adicionou-se 100µL do lisado a 600µL de agarose *low-melting point* (0.8%), agitou-se em vórtex e 100µL dessa mistura foram imobilizados em lâmina de microscópio, previamente preparada com agarose *low-melting point* (0.5%). Essas lâminas foram mantidas por 5 minutos em refrigerador e após esse período foram expostas a H₂O₂ (150 µmol/L) durante 1 h 30 min (FAROMBI, 2004). Em seguida as lâminas foram lavadas em água bidestilada e imersas em solução de lise (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH 10) onde permaneceram a 4 °C durante 1 h.

A lise com detergente não-aniônico e em alta molaridade é necessária para a remoção das membranas, citoplasma e nucleoplasma, além de promover a solubilização de estonas pela alta concentração salina. Após a lise as lâminas foram novamente lavadas em água bidestilada por 3 vezes de 20 min. cada, garantindo a remoção total da solução de lise. Em seguida as lâminas foram acondicionadas em cuba de eletroforese contendo tampão alcalino fresco (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) por 20 min a 4°C para o desdobramento do DNA. A seguir foi iniciada a eletroforese a 4°C por 20 min em 25V e 300 mA (ESPÍNDOLA, *et al.*, 2005). Depois da corrida, as lâminas foram neutralizadas com TRIS 0.4 M (pH 7.5).

As lâminas foram mantidas a temperatura ambiente até ficarem secas e em seguida foram fixadas. A fixação foi realizada por 10 min em solução fixadora (15% de ácido tricloroacético, 5% de sulfato de Zinco e 4% de glicerina dissolvidos em água bidestilada) e após essa etapa as lâminas foram novamente lavadas e secas em temperatura ambiente. Seguiu-se a coloração das lâminas com nitrato de prata (NADIN *et al.*, 2001).

Tecido hepático de ratos do grupo N foi submetido ou não a H₂O₂ (10% da concentração final, 15 min sob sonicação e a temperatura ambiente) e foi utilizado como controle positivo e negativo respectivamente (TOLEDO *et al.*, 2003). Todas as lâminas foram confeccionadas em duplicata.

O comprimento dos cometas foi avaliado usando o mesmo sistema de análise de imagens descrito e. 4.1.7 e utilizado para leitura das LPN positivas para GST-P. Após a codificação das lâminas, foram medidos uma centena de nucleóides por animal (50 imagens por lâmina). A viabilidade das células hepáticas foi determinada indiretamente pela análise das imagens após a eletroforese. A imagem dos cometas foi considerada inviável quando estes apresentavam cauda com aspecto de balão, o que caracteriza células necróticas ou em apoptose. A viabilidade da suspensão de células foi

considerada aceitável quando a frequência dessas imagens foi inferior a 2% (BARBISAN, *et al.*, 2003).

4.1.9 Determinação das Concentrações Hepáticas de Luteína

Para a determinação das concentrações hepáticas de luteína foram colhidos fragmentos do fígado de cada animal experimental e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, e posteriormente armazenados em freezer a -80°C. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Nutrição do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no campus de Ribeirão Preto/SP, onde foi realizada a quantificação do carotenóide por CLAE.

O equipamento utilizado para detecção foi um Shimadzu LC 9A (Shimadzu, Japão) com sistema de bombeamento para multissolventes, auto injetor e detector UV-VIS. Uma pequena alíquota (20µL) de amostra foi injetada no cromatógrafo utilizando-se coluna de fase reversa C18 (CLC-ODS). Os compostos foram eluídos pela fase móvel composta de acetonitrila (Mallinckrodt), diclorometano (Merck) e metanol (Merck), este último com 0,05% de acetato de amônia (Merck). Todos os reagentes utilizados foram de grau CLAE nas proporções de 70:20:10. A detecção do carotenóide foi realizada no comprimento de onda de 450 nm. As concentrações hepáticas foram determinadas por meio da comparação entre os tempos de retenção das amostras e do padrão de luteína, quantificadas pela área do pico e expressas em µg/g de tecido hepático (ARNAULD *et al.*, 1991; BARUA *et al.*, 1993).

4.2 Protocolo Experimental II – Aplicação do Carcinógeno DEN

4.2.1 Preparo do Suco

Os sucos administrados no protocolo experimental II foram preparados essencialmente como descritos na seção 4.1.1. Nesse experimento optou-se por utilizar o dobro das hortaliças, portanto utilizamos a concentração de 20% (p/v) de couve ou de repolho.

Essa concentração de 20% foi igualmente testada em estudos prévios que incluíram a avaliação da sedimentação das hortaliças quando adicionadas à água e a aceitação de animais em estudo piloto durante 10 dias.

4.2.2 Quantificação de Glicosinolatos

O conteúdo de glicosinolatos foi determinado nas hortaliças utilizadas no protocolo experimental II. Para tanto retiramos uma alíquota de 10g de cada uma das hortaliças, durante o decorrer do experimento (aproximadamente 30g por semana). As hortaliças foram trituradas e armazenadas a -80°C.

Ao final do experimento juntou-se todas as alíquotas, que foram liofilizadas e enviadas para o *Institute of Food Research* em Norwich no Reino Unido, onde o professor Richard Bennett gentilmente realizou a quantificação de glicosinolatos em CLAE e em triplicata, de acordo com Bennnett *et al.* (2004).

4.2.3 Animais

Os animais utilizados neste experimento foram adquiridos e mantidos nas mesmas condições citadas anteriormente para o primeiro estudo (seção 4.1.2).

4.2.4 Protocolo Experimental II

Após um período de aclimação de 7 dias, com exceção de 8 animais que constituíram um grupo controle a parte de ratos considerados “Normais” (**N**), e que não foram submetidos a qualquer procedimento experimental durante todo o estudo, mas apenas permaneceram nas mesmas dependências que os outros grupos experimentais, outros 24 animais foram utilizados e distribuídos aleatoriamente em 3 diferentes grupos, cada um com 8 animais, a saber:

Grupo água (A): os animais deste grupo receberam apenas água destilada, e constituíram assim o grupo controle. Vinte e quatro horas antes do sacrifício esses animais foram submetidos à aplicação via i.p. de DEN (20mg/kg de p.c.) (Figura 5).

Grupo couve (C): os animais deste grupo receberam diariamente na água de beber 20% de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) por 8 semanas consecutivas até o dia do sacrifício. Vinte e quatro horas antes do sacrifício esses animais foram submetidos à aplicação via i.p. de DEN (20mg/kg de p.c.) (Figura 5).

Grupo repolho (R): os animais deste grupo receberam diariamente na água de beber repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) na concentração de 20% p/v, por 8 semanas consecutivas até o dia do sacrifício. Vinte e quatro horas antes do sacrifício esses animais foram submetidos à aplicação via i.p. de DEN (20mg/kg de p.c.) (Figura 5).

4.2.5 Aplicação do Carcinogênico

Para análise dos possíveis efeitos das hortaliças couve ou repolho na inibição de danos em DNA, na formação 8-OHdG e na expressão diferencial de genes relacionados a toxicologia, foi aplicada via i.p., uma dose

única (20mg/kg de p.c.) do agente carcinogênico DEN (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, USA) dissolvido em NaCl 0,9%. Essa aplicação ocorreu 24h antes do sacrifício dos animais e dois meses após o início da suplementação com as hortaliças, conforme a representação esquemática da figura 5.

Na oitava semana todos os animais foram eutanasiados por exsanguinação após anestesia com éter, da mesma forma descrita no protocolo experimental I (seção 4.1.4).

Nesse experimento, além do fígado também foi coletada a mucosa do cólon dos animais. Após a retirada do fígado, removeu-se todo o intestino grosso, desde o ceco até o reto. O órgão foi lavado com solução fisiológica gelada, aberto longitudinalmente e a mucosa foi raspada com o auxílio de lâminas de bisturi, armazenada em papel alumínio e imediatamente congelada em nitrogênio líquido.

Figura 5. Representação esquemática do protocolo experimental II para a avaliação dos possíveis efeitos da couve ou do repolho quando administrados durante 8 semanas consecutivas a ratos Wistar.

4.2.6 Análise de Danos em DNA

O cometa alcalino para amostras de tecido hepático dos animais do protocolo experimental II, foi realizado essencialmente como o descrito para o experimento I, excluindo-se apenas a etapa de sensibilização com o H₂O₂. Essa etapa foi retirada porque esse experimento visava avaliar apenas danos causados pela DEN.

4.2.7 Quantificação de 8-OHdG em DNA Hepático

Para avaliar a quantitativamente as bases modificadas de DNA 8-OHdG, utilizou-se o método de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Os danos resultantes da aplicação do carcinogênico foram quantificados por comparação entre o grupo N e o grupo A, e também verificou-se se as hortaliças fornecidas na água de beber na concentração de 20% exerceram alguma influência neste parâmetro. Para tanto utilizou-se um kit comercial de ELISA (News check 8-OHdG, Jaica - Japão). Para a aplicação do kit, foi necessário preparo prévio da amostra a ser aplicada em microplaca. Os passos a seguir são essenciais para esse procedimento.

4.2.7.1 Extração e Purificação do DNA Genômico de Tecido Hepático

Para a realização desta etapa utilizou-se um kit comercial (Wizard SV Genomic DNA Purification System – Promega), seguindo as instruções do fabricante.

Aproximadamente 20mg de fígado foram pesados e colocados em tubos de micro centrífuga. Em seguida adicionou-se a solução de digestão (solução de lise do núcleo, EDTA, proteinase K e RNase A) e as amostras

foram incubadas por um período de 16-18h a 55⁰C a fim de assegurar a completa digestão do tecido. No dia seguinte adicionou-se a solução tampão de lise, seguida de agitação.

Para purificação do DNA genômico, transferiu-se o lisado para um tubo coletor contendo uma mini-coluna acoplada. Procedeu-se a centrifugação para ligação do DNA genômico à mini-coluna e posteriormente, o líquido do tubo coletor foi descartado. A mini-coluna foi lavada com solução de lavagem adicionada de 95% de etanol e centrifugada, novamente descartando-se o líquido do tubo coletor; essa etapa foi repetida por mais quatro vezes. Após a lavagem, procedeu-se a centrifugação apenas da mini-coluna para secar a matriz, sendo esta mini-coluna transferida para um novo tubo. Foi adicionada água livre de nuclease, com posterior incubação durante dois minutos a temperatura ambiente e centrifugação para eluição. O procedimento foi repetido e o DNA genômico purificado foi obtido na água livre de nuclease. O DNA foi precipitado com etanol e acetato de sódio (0,1%, 3M, pH 7 a -80⁰C), centrifugado, seco e estocado a -20⁰C até o uso.

4.2.7.2 Quantificação do DNA

O pelet de DNA, obtido na etapa descrita acima, foi dissolvido em 100 µL de água bidestilada. Uma alíquota de cada amostra foi retirada para leitura em espectrofotômetro (260 e 280 nm). Como previamente estabelecido em literatura, uma unidade de absorbância (O.D.) contém 50µg de DNA por mL de solução. A partir dessa informação calculou-se a quantidade de DNA presente em cada amostra. Aliquotou-se a quantidade necessária de para composição de um pool, com aproximadamente 3 µg de DNA, para cada grupo experimental (N, A, C e R).

4.2.7.3 Digestão do DNA

O *pool* de cada grupo experimental foi seco em *speed vac* e ressuspenso em 30 μ L de água bidestilada. Segundo o protocolo de Park, *et al.* (2005), utilizou-se três enzimas para digestão do DNA, procedendo da seguinte maneira: acrescentaram-se 3 μ L de TRIS-HCl 200 mM e 3 μ L de $MgCl_2$ 2M e 1 unidade de DNase I. Essa mistura foi incubada durante 18h a 37°C. Após esse processo, ajustou-se o pH para 8,9 com tampão acetato-glicina 0,2M (pH 10), foram adicionadas 0,025 unidades de fosfodiesterase I (PDE I) e incubou-se por 8h a 37°C. Finalmente o pH foi ajustado para 8,6 com tampão TRIS-HCl 50 mM pH 7,4 contendo 50 mM de $MgCl_2$ e posteriormente foi adicionada 0,1 unidade de fosfatase alcalina por 2h a 37°C. O DNA digerido teve novamente o pH ajustado agora para 5.5 com ácido acético e foi estocado a -20°C até análise de ELISA.

Para assegurar a completa digestão do DNA uma alíquota foi aplicada em gel de agarose e submetida a eletroforese.

4.2.7.4 ELISA para Quantificação de 8-OHdG

Seguindo as instruções do fabricante, inicialmente as amostras ou os padrões (fornecidos no kit) e o anticorpo primário foram colocados na microplaca e incubados a 37°C por 1h. Em seguida a placa foi lavada 3 vezes com solução de lavagem e incubada com o anticorpo secundário a 37°C por 1h, seguida por 3 outras lavagens, pelo acondicionamento do substrato enzimático responsável pela cor. Após isto, a placa permaneceu no escuro e à temperatura ambiente durante 15 minutos para ação do substrato. Adicionou-se então solução de término de reação de coloração. A leitura foi realizada em leitor de microplaca no comprimento de onda de 450nm.

A partir da absorbância dos padrões foi contruída uma curva padrão e realizado o cálculo das quantidades de 8-OHdG presentes em cada amostra com o auxílio do programa de estatística *Graphpad prisma*.

4.2.8 Análise de Genes Diferencialmente Expressos (*Macroarray*)

Neste trabalho foi utilizada uma membrana de nylon, fabricada pela Clontech (USA). As membranas foram adquiridas na forma de kit juntamente com todos os reagentes necessários para a condução da análise. Esse kit continha 4 membranas (Atlas rat toxicology 1.2 array), as quais apresentavam 1176 seqüências parciais ou completas em fita simples de DNA, relacionadas a toxicologia, além de 9 genes controle, sendo estes últimos utilizados para fazer a normalização dos valores obtidos. Cada membrana pode ser utilizada até três vezes.

A partir do mRNA obtido das células em estudos foram produzidas sondas de cDNA (DNA complementar), via transcrição reversa na presença de um nucleotídeo marcado ($\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP) permitindo assim sua posterior detecção. As sondas de cDNA marcadas são hibridizadas aos arranjos da membrana utilizando os seguintes procedimentos:

4.2.8.1 Extração do RNA total e Purificação do mRNA (poli A⁺)

A extração do RNA total dos tecidos analisados (fígado e mucosa do cólon) foi realizada com o reagente TRIZOL (Invitrogen Life technologies, Carlsbad, CA, EUA), que consiste em uma solução monofásica de fenol e de isotiocianato de guanidina. O RNA total foi extraído conforme instruções do fabricante e dissolvido em água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato).

Uma alíquota de cada amostra foi retirada para leitura em espectrofotômetro (Gene quant, biochrom) em comprimento de onda de 260 e 280 nm. A qualidade do RNA obtido foi verificada em gel de agarose a 1% com brometo de etídio (considerada satisfatória quando observaram-se nitidamente as bandas 18S e 28S), e por meio da razão espectrofotométrica entre DO_{260}/DO_{280} (considerada satisfatória quando esteve acima de 1,8).

A partir da concentração fornecida pelo espectrofotômetro, , aliqüotou-se a quantidade necessária de cada amostra para composição de um *pool*, com aproximadamente 1 mg de RNA total, para cada grupo experimental (N, A, C e R).

A partir do *pool* de RNA total isolou-se o mRNA (poli A⁺), com o auxílio do kit “polyATtract[®] mRNA isolation systems” (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Esse kit utiliza a tecnologia de esferas magnéticas para isolar o poli A⁺ de possíveis contaminantes como DNA genômico ou proteínas..

4.2.8.2 Síntese de cDNA Marcado Radioativamente

Para síntese de cDNA utilizou-se 1µg de mRNA. Os cDNAs foram sintetizados através da reação da transcriptase reversa, utilizando termociclador (PCR), de acordo com as instruções do kit (Clontech). Os tubos contendo o mRNA das amostras e o “CDS primer mix” proveniente do kit foram aquecidos a 70° C por 2 minutos, em seguida a temperatura foi reduzida para 50° Ce foi adicionado 1 µL de transcriptase reversa e incubado novamente por 2 min. Após esse período foi adicionado o mix de nucleotídeos e 0,5 µl de $\alpha^{32}P$ -dCTP (10 µCi/ µL; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), e os tubos foram novamente mantidos em termociclador por 45 min. O cDNA marcado com o isótopo radioativo (sonda) foi purificado em mini colunas cromatográficas.

Para preparar a sonda para a hibridização foram adicionados 5 μ L de C₀t-1 (agente bloqueador) às amostras e incubou-se em água fervente (95-100° C) seguido de incubação em gelo, ambas durante 2 min cada. Esse procedimento é necessário para desnaturar a sonda.

Todos os reagentes e soluções contaminados com material radioativo foram descartados em recipiente e local adequados.

4.2.8.3 Hibridização e Aquisição de Imagens

Inicialmente as membranas foram lavadas com água bidestilada autoclavada. Em seguida, em garrafas de vidro, seguiu-se a pré-hibridização com a solução “expressHyb” (Clontech) e DNA de esperma de salmão (Sigma) desnaturado, durante no mínimo 1h e em agitação contínua a 68°C (em forno de hibridização). Após esse procedimento as sondas foram adicionadas a solução de pré-hibridização onde permaneceram durante a noite (16-20h), em temperatura de 68°C e em agitação contínua, garantindo que toda a membrana permanecesse coberta pela solução de hibridização, e, conseqüentemente em contato constante com as sondas.

No dia seguinte as membranas foram lavadas com 2 vezes SSC1%SDS em temperatura ambiente, esse procedimento foi realizado 2 vezes para a membrana hibridizada com mRNA hepático e uma vez para mRNA de cólon. Com o auxílio de um contador “Geiger”, verificou-se a intensidade do sinal. Em seguida as membranas foram embaladas individualmente em filme plástico e colocadas para expor em um filme de raio X, a -80°C. A revelação ocorreu em tempos diferentes, variando de 2 a 10 dias, de acordo com a intensidade do sinal.

As imagens dos filmes foram digitalizadas em densitômetro (GS 700 - Bio Rad) com o auxílio do software “Molecular Analyst”. As imagens geradas foram analisadas no software “Quantity One”, que gerou tabelas de

dados referentes a densidade ótica de cada ponto onde ocorreu a hibridização (região da membrana contendo um único gene). Cada gene recebeu um valor numérico de acordo com a sua respectiva intensidade na imagem. Após a quantificação dos sinais o *background* (sinal de fundo presente em toda a membrana) foi subtraído do valor referente a cada ponto. A tabela de valores foi exportada para uma planilha do programa “Excel” (Microsoft). Em seguida os valores foram normalizados, dividindo-se cada ponto pela média dos valores dos genes controle.

Neste trabalho a análise dos padrões diferenciais de expressão gênica foi realizada através da razão da intensidade dos genes do grupo A pelo grupo N, e pelos grupos C e R divididos pelo grupo A. Os genes foram considerados diferencialmente expressos quando apresentaram a razão ≥ 2 (hiperexpressos) ou $\leq 0,5$ (hipoexpressos).

Os genes considerados diferencialmente expressos foram submetidos à análise de agrupamento hierárquico não supervisionado com o auxílio do programa GESS 2006.

4.3 RT-PCR

Para confirmação da expressão diferencial alguns genes foram selecionados para realização da análise de RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase – transcrição reversa). A transcrição reversa para produção do cDNA foi realizada de acordo com instruções do kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, EUA) a partir de 1µg de RNA total, aliqüotado da mesma extração utilizada para realização do macroarray, tanto em tecido hepático quanto em mucosa de cólon.

Para a amplificação dos genes selecionados bem como do gene

GAPDH (gene controle), foram utilizados os seguintes primers:

Gene	GenBank	Sentido	Anti-sentido
Antígeno de Proliferação Celular Nuclear (PCNA) ¹	Y00047	GCC CTC AAA GAC CTC ATC AA	GCT CCC CAC TCG CAG AAA AC
Glutathione S-transferase, AY (GSTAY) ¹	K01931	CAG GAT CCA GCA TAT GCC GGG GAA GCC AGT CCT	CGC CGG AGT GGA TCC GTG TGG GTA CAG TGT ATC CAT A
Citocromo P450 3A1 (CYP3A1) ¹	M10161	GAT GTT GAA ATC AAT GGT GTG T	TTC AGA GGT ATC TGT GTT TCC
Glutathione redutase (GTR) ¹	U73174	GCC CAC GGT TCC TCA TGA	GAA AGA ACC CAT CAC TGG TTA TCC
Glutathione S-transferase, pi 1 (GSTPI) ²	X02904	TGA TTC TGC CAT CTT TCT GC	CCA GCT TCT CTG GAC AAA CC
Citocromo P450, XVII (CYP17) ²	M21208	AAG TGG ATC CTG GCT TTC CT	CAA TGC TGG AGT CAA CGT TA
Citocromo P450, 19 (CYP17) ²	M33986	CTG CTG ATC ATG GGC CTC C	CTC CAC AGG CTC GGG TTG TT
8-oxoguanina-DNA-glicosilase (OGG1) ²	AF029690	ATC TGT TCT TCC AAC AAC AAC	GCC AGC ATA AGG TCC CCA CAG
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) ³		TGG TGA AGG TCG GTG TGA AC	AGG GGT CGT TGA TGG CAA CA

Tabela 1: ¹Primers Cólon; ²Primers Cólon; ³Primer Controle.

Cada reação de PCR foi composta por tampão de PCR 1X (16,6 mM sulfato de amônio/ 67 mM Tris, pH 8,8/ 6,7 mM MgCl₂/ 10 mM 2-mercaptoetanol), dNTPs (10mM cada), primers (300 ng cada), 1,25 U de Taq polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase – Invitrogen) e 2ul do resultante do cDNA em volume final de 50ul.

A reação foi realizada em termociclador Eppendorf epMastercycler (Eppendorf, Alemanha). As reações foram iniciadas a 95 ° C por 10 min. e a amplificação dos genes foram conduzidas por 35 ciclos: 40 s. à 95 °C, 1 min. à temperatura de associação 55° C, 1 min. à 72 °C e, finalmente, 10 min. de extensão final a 72 °C.

O resultado da PCR (15µL) foi adicionada de 3µL de azul de bromofenol diluído em glicerol e aplicado em gel de agarose 1% contendo 0,1% de syber green (corante).

A quantificação da expressão foi realizada pela razão dos valores obtidos por densitometria dos genes em estudo e do GAPDH. Da mesma forma que no macroarray a análise dos padrões diferenciais de expressão gênica foi realizada através da razão da intensidade dos genes do grupo A pelo grupo N, e pelos grupos C e R divididos pelo grupo A, para cada gene. Os genes foram considerados diferencialmente expressos quando apresentaram a razão ≥ 2 (hiperexpressos) ou $\leq 0,5$ (hipoexpressos).

4.3 Análise Estatística

Para realização da análise estatística utilizou-se o programa SigmaStat (Jandel Scientific, EUA). Nos casos em que a distribuição dos

dados se apresentou normal e com homogeneidade de variância, utilizou-se o teste one-way ANOVA, seguido do teste t de Student para amostras não pareadas. Quando isso não ocorreu, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, análise de variância não-paramétrica, seguido do teste de Mann-Whitney. Em todos os casos o nível de confiança utilizado foi de 95%.

5 RESULTADOS

5.1 Observações Gerais Relativas aos Ratos Wistar Submetidos ao Protocolo Experimental I

A evolução do peso dos animais está representada na figura 6. O peso médio foi crescente do início do experimento até o momento em que receberam a aplicação do agente iniciante DEN. A queda de peso, entretanto, é um indicativo da efetividade do agente carcinogênico. No terceiro dia após a DEN os animais voltaram a ganhar peso, e assim continuou até a hepatectomia parcial, onde o peso médio dos grupos teve uma nova queda, desta vez mais acentuada. Dois dias após a hepatectomia, o peso voltou a evoluir de maneira crescente até a eutanásia dos animais.

A queda de peso, tanto por aplicação da DEN, quanto por ocasião da hepatectomia foi acompanhada de queda no consumo de ração e de líquido, apresentados nas figuras 7 e 8 respectivamente. Vale ressaltar que o grupo N não teve grandes oscilações de peso ou de consumo de ração e líquido, o que já era esperado, pois estes animais não foram submetidos a nenhum tratamento.

Figura 6: Evolução do peso de ratos Wistar normais (N) ou submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de "Ito" e tratados com água (A, controle), couve (C) ou repolho (R) na água de beber (10% p/v). DEN= dietilnitrosamina, HP= hepatectomia parcial, E= eutanásia.

Figura 7: Consumo de ração de ratos Wistar normais (N) ou submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de "Ito" e tratados com água (A, controle), couve (C) ou repolho (R) na água de beber (10% p/v). DEN= dietilnitrosamina, HP= hepatectomia parcial, E= eutanásia.

Figura 8: Consumo de líquido de ratos Wistar normais (N) ou submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de “Ito” e tratados com água (A, controle), couve (C) ou repolho (R) na água de beber (10% p/v). DEN= dietilnitrosamina, HP= hepatectomia parcial, E= eutanásia.

A tabela 2 apresenta os valores de peso corporal (p.c.) médio, ao início e ao final do experimento, de peso absoluto e relativo do fígado, de consumo de ração e de líquido.

De acordo com a tabela 2 é possível observar que não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos em relação ao peso inicial, o que indica que a distribuição dos animais foi realizada de maneira adequada e aleatória. Além disso, não foram observadas diferenças significativas ($P>0,05$) entre os grupos experimentais quanto ao peso final dos animais, peso absoluto ou relativo do fígado, bem como consumo de ração e líquido. Esses resultados indicam que nas concentrações fornecidas, as hortaliças *brassicas* couve e repolho foram bem aceitas pelos animais e não apresentaram toxicidade aparente.

Tabela 2: Peso Corporal inicial e final, peso absoluto e relativo do fígado e consumo de ração e de líquido de ratos Wistar normais (N) ou submetidos a modelo de hepatocarcinogênese de "lto" e tratados com água (A, controle), couve (C) ou repolho (R) na água de beber (10% p/v).

Grupos	n	pc inicial (g)	pc final (g)	Peso absoluto do fígado (g)	Peso relativo do fígado (g/100g de pc)	Ração consumida (g/ 100 g de pc/dia)	Líquido consumido (mL/100g de pc/dia)
N	8	98,9 ± 8,2	382 ± 22,9	10,4 ± 0,5	2,3 ± 0,1	8,7 ± 2,3	15,3 ± 4,4
A	15	101,5 ± 5,7	345 ± 24,4	8,0 ± 1,0	2,3 ± 0,2	8,8 ± 2,5	16,0 ± 4,2
C	14	99,47 ± 5,8	338,4 ± 22,4	7,8 ± 1,0	2,3 ± 0,2	8,4 ± 2,4	16,4 ± 4,9
R	14	101,7 ± 5,7	338,1 ± 26,0	8,1 ± 0,9	2,4 ± 0,2	8,3 ± 2,4	14,8 ± 4,4

pc = peso corporal;

Valores em média ± desvio padrão.

5.2 Análise Morfométrica de LPN Hepáticas

A marcação imunoistoquímica para GST-P é amplamente aceita como um biomarcador para LPN hepáticas. Apenas cortes de fígado de animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de “Ito” foram submetidos a essa técnica, excluindo-se os animais do grupo N.

Quando comparados ao grupo controle, constata-se que os animais dos grupos couve e repolho não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) em relação ao número e área agregada de LPN GST-P positivas. Os dados referentes à análise morfométrica das LPN estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Análise morfométrica de LPN GST-P positivas de ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de “Ito”, e tratados com água (A, controle), couve (C) ou repolho (R) na água de beber (10% p/v).

Grupos	n	Número de LPN por cm ²	Área agregada (mm ² /cm ²)
A	15	16 ± 8	0,41 ± 0,23
C	14	18 ± 11	0,37 ± 0,20
R	14	20 ± 6	0,49 ± 0,15

Valores em média ± desvio padrão.

As Figuras 9A e B ilustram exemplos de LPN GST-P positivas observadas.

Figura 9: Fotomicrografia de corte histológico de fígado de ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de “Ito” e tratados com as hortaliças couve (A) ou repolho (B) adicionadas a água de beber na concentração de 10% p/v. A parte delimitada representa LPN GST-P positiva. Aumento de 10x.

5.3 Avaliação da Apoptose

A apoptose foi avaliada nos cortes de fígado de ratos marcados imunoistoquimicamente para GST-P e contracolorados com H&E. Isso possibilitou a identificação dos corpúsculos apoptóticos dentro e fora das lesões. Os dados referentes a apoptose hepática estão representados na tabela 4.

Tabela 4: Número de Corpúsculos Apoptóticos (CA) hepáticos nas áreas de tecido “normal” ao redor das lesões pré-neoplásicas (LPN), e nas LPN de cortes de fígado de ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de “Ito” e tratados com água (A, controle), couve (C) ou repolho (R) na água de beber (10% p/v).

Grupos	n.	N. de CA/cm ²	
		Área ao redor das LPN	LPN
A	15	0,18 ± 0,09	1,08 ± 0,21 ^a
C	14	0,18 ± 0,12	1,23 ± 0,21 ^a
R	14	0,21 ± 0,10	0,88 ± 0,12 ^a

Valores em média ± desvio padrão.

^a diferença significativa de acordo com o teste de Mann-Whitney ($P < 0.05$).

De acordo com a análise estatística dos dados apresentados na tabela 3 foi possível observar que não houve diferença ($P > 0.05$) entre os grupos experimentais com relação ao número de CA hepáticos tanto nas áreas ao redor das LPN GST-P positivas, quanto nas LPN. Contudo, é possível observar que em todos os grupos o número de CA hepáticos foi significativamente maior ($P < 0.05$) nas LPN em comparação às áreas sem alterações morfológicas ao redor das mesmas. Essa observação torna-se mais evidente quando os dados da tabela 3 são aplicados em gráfico como mostra a figura 10.

Figura 10: Quantificação de corpúsculos apoptóticos (CA). **A** = grupo controle; **C** = grupo couve; **R** = grupo repolho; LPN = lesões pré-neoplásicas.

* Valores diferentes ($P < 0,05$) com relação à área ao redor das LPN

5.4 Cometa Alcalino em DNA Hepático Sensibilizado com H_2O_2

O teste do cometa alcalino foi realizado em amostras de fígado de todos os animais experimentais. Animais do grupo normal serviram como controle positivo e negativo da técnica, quando submetidos ou não a H_2O_2 (100%) respectivamente. O controle positivo apresentou comprimento maior dos cometas ($P < 0,05$) que os demais grupos, ao passo que o controle negativo apresentou cometas menores ($P < 0,05$). Os animais dos grupos tratados com as hortaliças apresentaram danos reduzidos quando comparados ao controle do experimento. Os valores referentes ao comprimento médio dos cometas estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Comprimento dos “cometas” de DNA hepático de ratos do grupo normal submetidos a peróxido de hidrogênio (100%) ou não (controles positivo e negativo, respectivamente), e comprimento dos cometas de DNA hepático de animais submetidos ao modelo hepatocarcinogênese de “Ito”, tratados com água (A, controle), couve (C) ou repolho (R) na água de beber (10% p/v).

Grupos	N.	Comprimento dos Cometas (μm)
Controle positivo	15	$195,30 \pm 30,0$
Controle negativo	15	$93,82 \pm 7,1$
A	15	$120,91 \pm 12,7^a$
C	14	$110,82 \pm 10,0^{a,b}$
R	14	$107,61 \pm 7,8^{a,b}$

^a Diferença estatisticamente significativa quando comparados aos grupos controle positivo e negativo ($P < 0,05$)

^b Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) quando comparados ao grupo A. Diferenças observadas no teste ANOVA seguido do teste *t*.

A figura 11 ilustra fotomicrografias de cometas observados nos grupos experimentais.

Figura 11: Fotomicrografia dos cometas. Aumento de 100 vezes.

5.5 Quantificação Hepática de Luteína

A concentração hepática do carotenóide luteína no grupo controle (A) foi de $0,56 \pm 0,30 \mu\text{g/g}$ e nos grupos couve e repolho foi respectivamente de $4,1 \pm 1,05$ e $2,15 \pm 0,58 \mu\text{g/g}$. Os grupos couve e repolho apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle e entre si. A figura 12 ilustra esses resultados.

Figura 12: Concentração hepática de luteína de ratos Wistar submetidos ao protocolo experimental I; A= controle, C= couve, R= repolho;

* diferença significativa ($P < 0,05$) com relação ao grupo A e grupo R;

** diferença significativa ($P < 0,05$) com relação ao grupo A.

5.6 Observações Gerais Relativas aos Ratos Wistar Submetidos ao Protocolo Experimental II

Os animais experimentais de todos os grupos apresentaram evolução do peso médio crescente do início ao final do experimento, apresentando queda de peso apenas no último dia, devido à aplicação da DEN e jejum pré-eutanásia. Não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$) o que indica a adequação dos animais ao fornecimento das hortaliças couve e repolho na água de beber, na concentração de 20% p/v. A figura 13 representa a evolução do peso dos animais.

Também não houve diferença entre os grupos com relação ao consumo de ração e de líquido ao longo do experimento, como pode ser observado nas figuras 14 e 15.

Figura 13: Evolução do peso de ratos Wistar “normais” (N), ou submetidos à aplicação de DEN (dietilnitrosamina) 24h antes da E (eutanásia) e tratados durante 8 semanas com água (A), couve (C) ou repolho (R) na água de beber (20% p/v).

Figura 14: Consumo de ração de ratos Wistar “normais” (N) ou submetidos à aplicação de DEN (dietilnitrosamina) 24h antes da E (eutanásia) e tratados durante 8 semanas com água (A), couve (C) ou repolho (R) na água de beber (20% p/v).

Figura 15: Consumo de líquido de ratos Wistar normais (N) ou submetidos à aplicação de dietilnitrosamina (DEN) 24h antes da eutanásia (E) e tratados com água (A, controle), couve (C) ou repolho (R). As hortaliças foram adicionadas à água de beber na concentração de 20% p/v

A tabela 6 apresenta os valores relativos ao peso corporal médio, ao início e final do experimento, peso relativo do fígado, consumo de ração e de líquido de ratos Wistar submetidos ao protocolo experimental II.

Tabela 6: Peso Corporal inicial e final, peso relativo do fígado, consumo de ração e de líquido de ratos Wistar normais (N) ou submetidos à aplicação de DEN 24 h antes da eutanásia e tratados durante 8 semanas consecutivas, com água (A, controle), couve (C) ou repolho (R) na água de beber (20% p/v).

Grupos	n	p.c. inicial (g)	p.c. final (g)	P. relativo do fígado (g)	Consumo de ração (g/100g de p.c./dia)	Consumo de líquido (mL/100g de p.c./dia)
N	8	101,1 ± 2,3	342,9 ± 14,9	3,1 ± 0,3	10,5 ± 2,4	
A	8	99,6 ± 2,8	339,7 ± 21,7	2,9 ± 0,3	10,3 ± 2,5	16,2 ± 4,1
C	8	100,8 ± 2,1	326,5 ± 22,4	3,0 ± 0,2	10,3 ± 2,6	18,2 ± 4,2
R	8	100,8 ± 2,3	324 ± 13,5	2,9 ± 0,2	10,5 ± 2,6	15,4 ± 4

Valores em média ± desvio padrão
p. c. = peso corporal.

De acordo com a tabela 6 é possível observar que não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos em relação ao peso inicial, o que indica que a distribuição dos animais foi realizada de maneira adequada e aleatória. Além disso, também, não observou-se diferença ($P>0,05$) entre os grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados. Esses resultados indicam que o fornecimento de couve ou repolho na concentração de 20%, teve boa aceitação por parte dos animais e não induziu toxicidade aparente.

5.7 Quantificação de Glicosinolatos

O conteúdo total de glicosinolatos na couve foi de 3,3 $\mu\text{mol/g}$, onde 58% desse total correspondem a glucoiberina e 42% a sinigrina. Com relação ao repolho, o total de glicosinolatos foi de 11,67 $\mu\text{mol/g}$, onde 41% correspondem a glucoiberina, 27% a glucobrassicina, 14% a glucorafanina, 13% a sinigrina, 5% a 4-metoxiglucobrassicina. Os valores estão sumarizados na tabela 7.

Tabela 7: Conteúdo de glicosinolatos nas hortaliças couve e repolho utilizadas no experimento II.

Glicosinolatos	Couve	Repolho
Glucoiberina	1,9 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,5
Sinigrina	1,4 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,4
Glucorafanina	0,0	1,6 $\pm$ 0,2
Glucobrassicina	0,0	3,2 $\pm$ 0,1
4- metoxiglucobrassicina	0,0	0,6 $\pm$ 0,0
Total de glicosinolatos	3,3	11,7

* Os valores representam o conteúdo de glicosinolatos em $\mu\text{mol/g}$ em base seca, $\pm$ desvio padrão.

5.8 Cometa Alcalino

O cometa é um método conveniente e sensível para medir danos de “quebra” em DNA de tecidos. Essa técnica pode inclusive ser aplicada em humanos, para detectar danos em linfócitos, e é utilizada em estudos não invasivos. A tabela 8 apresenta os dados referentes ao comprimento dos cometas.

Tabela 8: Comprimento dos cometas de fígado de ratos normais submetidos a H₂O₂ (100%) ou não e utilizados como controle positivo e negativo da técnica respectivamente, e de animais submetidos à aplicação de DEN e tratados com água (A), couve (C) ou repolho (R), na água de beber (20% p/v).

Grupos	N.	Comprimento dos Cometas (μm)
Controle negativo	8	90,33 ± 6,0 ^a
Controle positivo	8	196,46 ± 13,5 ^a
A	8	107,49 ± 6,1
C	8	104,41 ± 4,66
R	8	106,21 ± 4,4

Valores em média ± desvio padrão;

^a Valores diferentes ($P < 0,05$) entre si e com relação aos demais grupos

O teste do cometa alcalino foi realizado em amostras de fígado de todos os animais experimentais. Animais do grupo normal serviram como controle positivo e negativo da técnica, quando submetidos ou não a H_2O_2 (100%) respectivamente. A exemplo do primeiro experimento, o controle positivo apresentou comprimento dos cometas maior ($P<0,05$) que os demais grupos, ao passo que o controle negativo apresentou cometas menores ($P<0,05$). Entretanto não foram encontradas diferenças ($P>0,05$) entre os grupos experimentais.

5.9 ELISA para 8-OHdG

Os níveis de 8-OHdG foram determinados como auxílio de um kit comercial de ELISA (Jaica/ Biotech8-OHdG check). O próprio kit fornece padrões com quantidades determinadas de 8-OHdG. A partir da absorbância dos padrões realizou-se, como o auxílio do programa de estatística *Graphpad prism*, o cálculo da quantidade de 8-OHdG contida em *pool* de DNA de cada grupo experimental. Os resultados estão mostrados na figura 16.

Houve diferenças significativas ($P<0,05$) entre o grupo N ($1,08 \pm 0,14$), que não foi submetido à aplicação do carcinógeno e os grupos que receberam aplicação em dose única de DEN (20 mg/kg de p.c.) A ($1,84 \pm 0,59$), C ($1,73 \pm 0,25$), e R ($3,50 \pm 0,54$). Entre os três grupos que receberam a DEN, verificou-se aumento significativo ($P<0,05$) do grupo R, quando comparado aos grupos A e C. Entre os grupos A e C não houve diferença significativa ($P>0,05$).

Figura 16: Concentração de 8-OHdG (8-hidroxideoxi-2-guanosina) em DNA hepático de ratos Wistar normais (N) ou submetidos à aplicação de DEN (dietilnitrosamina) e tratados com água (A, controle), couve (C) ou repolho (R) na água de beber (20% p/v).

* Diferenças significativas ($P < 0,05$) entre com relação ao grupo N

** Diferença significativa ($P < 0,05$) entre com relação aos demais grupos

5.10 Macroarray

Essa análise serve de varredura para avaliação do perfil global de expressão gênica de forma semi-quantitativa, por essa razão utilizaram-se critérios rígidos para designar genes como diferencialmente expressos.

Dessa forma no fígado dos ratos, 29 genes foram diferencialmente expressos, destes 21 hipoexpressos ($\leq 0,5$), e apenas 8 hiperexpressos (≥ 2). A variação da expressão gênica foi de 0,42 a 2,44 vezes.

Considerando-se os genes diferencialmente expressos em animais que receberam a DEN (grupo A - controle) em comparação com animais normais (grupo N); e os grupos couve (C) e repolho (R), que também receberam a DEN e foram comparados com o grupo A, foram observadas algumas das categorias funcionais moduladas. Essa classificação funcional, bem como o código do GenBank e o valor de expressão diferencial dos genes de fígado de ratos estão representados na tabela 9.

Tabela 9: Genes diferencialmente expressos em fígado de ratos submetidos à aplicação de DEN e tratados com água (controle-A) comparados a ratos normais (N) e em fígado de ratos submetidos à aplicação de DEN e tratados couve (C) ou repolho (R), na água de beber (20% p/v), comparados a ratos controle (A).

Gene	Genbank	Classificação Funcional	A/N	C/A	R/A
Proteoglicana condroitina sulfato 5	U33553	Comunicação celular	1,01	0,88	0,46*
Protocaderina 4	AB004276	Comunicação celular	0,94	0,86	0,49*
Vírus da imunodeficiência humana tipo I, proteína ligada ao promotor 2	M65251	Proteína do núcleo	1,04	1,16	0,48*
Ciclina G1	X70871	Ciclo celular	0,96	0,96	0,46*
Glutathione S-transferase, pi 1	X02904	Metabolismo de xenobióticos	0,71	1,01	0,49*
Monoxigenase 1 contendo flavina	M84719	Metabolismo de xenobióticos	1,01	1,09	0,49*
Monoxigenase 4 contendo flavina	Z11737	Metabolismo de xenobióticos	1,04	0,97	0,43*
Carreador de soluto família 7 membro 3	AB000113	Transporte	0,46*	2,15**	1,15
Fibronectina 1	X05834	Proteína da matriz extracelular	0,99	1,12	0,49*
Aldolase C, frutose-bifosfato	X06984	Metabolismo	0,69	0,83	0,50*
Alfa1,2-fucosil transferase a	L26009	Metabolismo	0,80	0,86	0,47*
Glucagon	K02809	Metabolismo	0,80	0,81	0,48*
Glicogenina	AF021343	Metabolismo	0,75	0,84	0,50*
Álcool desidrogenase (classe I), alfa polipeptídeo	M15327	Metabolismo	0,92	0,97	0,44*
H ⁺ -ATP sintase mitocondrial subunidade alfa	X56133	Metabolismo	0,76	0,72	0,43*
Lipase hepática	M16235	Metabolismo	0,90	0,81	0,47*
Lipase pancreática	M58369	Metabolismo	0,79	0,73	0,46*

* Genes hipoexpressos

** Genes hiperexpressos

Tabela 9: continuação

Gene	Genbank	Classificação Funcional	A/N	C/A	R/A
Citocromo P450, subfamília XVII	M21208	Metabolismo de xenobióticos	1,04	1,04	0,43*
Citocromo P450, 19, aromatase	M33986	Metabolismo de xenobióticos	0,92	0,77	0,42*
Adenine fosforibosil transferase (APRT)	L04970	Não classificado	0,90	0,77	0,42*
Timidina kinase 1	M22642	Metabolismo	0,88	0,79	0,48*
Receptor do fator neurotrópico ciliar, componente alfa	S54212	Não classificado	2,27**	1,46	1,14
Receptor do fator de crescimento epidermico, Oncogene	U65007	Fator de crescimento	2,07**	1,44	1,24
Receptor 2B de serotonina 5-hidroxitriptamina	X66842	Receptor de neurotransmissor	2,13**	1,53	1,25
Receptor de prolactina	NM_012630	Não classificado	1,01	2,04**	1,46
Receptor de somatostatina, subtipo 5	L04535	Receptor de hormônio	1,15	2,14**	1,83
Receptor do hormônio estimulante da tireóide	M25071	Receptor de hormônio	0,86	2,07**	1,58
Receptor do ácido gama-aminobutirico, subunidade alfa 5, (GABA-A)	L08494	Receptor de neurotransmissor	0,91	2,44**	1,92
8-oxoguanina-DNA-glicosilase	AF029690	Proteína de reparo ao DNA	0,64	1,42	0,43*

* Genes hipoexpressos

** Genes hiperexpressos

Vinte e um genes mostraram-se hipoexpressos ($\leq 0,50$), quando comparou-se a expressão entre os grupos pré-estabelecidos (A/N; C/A; R/A). Estes genes estão distribuídos entre as seguintes classificações funcionais: metabolismo (31%), metabolismo de xenobióticos (17%), comunicação celular (7%), proteína do núcleo (3%), proteína da matriz extracelular (3%), ciclo celular (3%) proteína de reparo ao DNA (3%). Encontrou-se um gene não classificado funcionalmente (3%).

Os oito genes hiperexpressos (≥ 2), segundo o critério de comparação anteriormente citado (A/N; C/A; R/A) estão classificados em receptor de neurotransmissor (7%), receptor de hormônio (7%), transporte (3%) e fator de crescimento (3%). Encontrou-se também um gene não classificado funcionalmente (3%).

Quando observados apenas os genes do grupo A em comparação com o grupo N, foi encontrado um gene hipoexpresso ($\leq 0,50$), e três genes hiperexpressos (≥ 2).

Com relação ao grupo C comparado ao grupo A (controle) foram encontrados 5 genes hiperexpressos (≥ 2) e nenhum hipoexpresso ($\leq 0,50$).

O maior número de genes diferencialmente expressos foi encontrado no grupo R quando comparado ao grupo A (controle) que apresentou 21 genes todos hipoexpressos ($\leq 0,50$).

Foi encontrado apenas um gene comumente modulado. Este se estava hipoexpresso ($\leq 0,50$) no grupo A com relação ao grupo N, e hiperexpresso (≥ 2) no grupo C com relação ao grupo A.

O agrupamento hierárquico não supervisionado, utilizando a expressão diferencial destes 29 genes está representado na figura 17.

Figura 17 Agrupamento hierárquico não supervisionado em amostras de fígado de ratos submetidos à aplicação de DEN e tratados com água (controle-A) comparados a ratos normais (N) e em cólon de ratos submetidos à aplicação de DEN e tratados com couve (C) ou repolho (R), na água de beber (20% p/v), comparados a ratos controle (A). A variação de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hipereexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

Com relação ao cólon, foram encontrados um total de 31 genes diferencialmente expressos, destes 28 hipoexpressos ($\leq 0,5$) e 7 hiperexpressos (≥ 2). A variação da expressão gênica foi de 0,39 a 2,75 vezes.

Considerando-se os genes diferencialmente expressos em cólon de ratos que receberam a DEN (grupo A - controle) em comparação com animais normais (grupo N); e os grupos couve (C) e repolho (R), que também receberam a DEN comparados com o grupo A (controle), foram observadas algumas das categorias funcionais moduladas. A classificação funcional, o código do GenBank e o valor de expressão diferencial dos genes de cólon de ratos estão representados na tabela 10.

Estes genes estão classificados em metabolismo (10%), metabolismo de xenobióticos (30%), oncogenes (3%), transporte (10%) canal iônico (6%), ciclo celular (3%), proteína de resistência a drogas (3%), proteína de resposta ao estresse (3%), ciclo celular (3%), replicação do DNA (3%), além de genes não classificados funcionalmente (23%).

Quando foram observados apenas os genes do grupo A em comparação com o grupo N, foram encontrados 3 genes hipoexpressos ($\leq 0,50$) e 7 genes hiperexpressos (≥ 2).

Com relação ao grupo C comparado ao grupo A foram encontrados 10 genes hipoexpressos ($\leq 0,50$) e nenhum gene hiperexpresso (≥ 2).

A exemplo do que aconteceu no fígado, o maior número de genes diferencialmente expressos foi encontrado no grupo R quando comparado ao grupo A (controle), que apresentou 18 genes todos hipoexpressos ($\leq 0,50$).

Contudo no cólon verificou-se maior número de genes comumente modulados. Estes se encontraram entre os grupos A/N e C/A, onde 4 genes estavam hiperexpressos (≥ 2) na comparação A/N e os mesmos se encontraram hipoexpressos ($\leq 0,50$) na comparação C/A; e entre as comparações C/A e C/R 3 genes estavam hipoexpressos ($\leq 0,50$) em ambas as comparações.

Tabela 10: Genes diferencialmente expressos em cólon de ratos submetidos à aplicação de DEN e tratados com água (controle-A) comparados a ratos normais (N) e em fígado de ratos submetidos à aplicação de DEN e tratados com couve (C) ou repolho (R), na água de beber (20% p/v), comparados a ratos controle (A).

Gene	Genbank	Classificação Funcional	A/N	C/A	R/A
Fator de agrupamento 1 (macrófagos)	M84361	Não Classificado	0,41*	1,85	0,80
CDK2-alpha	D28753	Ciclo celular	0,42*	1,40	0,68
Antígeno de proliferação nuclear	Y00047	Replicação de DNA	0,79	0,80	0,45*
H-ras proto-oncogene; p21	M13011	Oncogene	0,94	0,48*	0,54
Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene	X68394	Oncogene	1,28	0,87	0,38*
Oncogene Pim-1	X63675	Oncogene	1,32	0,62	0,37*
Tirosina kinase	AF130457	Não Classificado	1,54	0,76	0,35*
Inibidor de serina proteinase, membro 1	M69246	Não Classificado	1,00	1,16	0,48*
Chaperonina 10	X71429	Não Classificado	1,26	0,68	0,48*
Ligante de ATP, subfamília B, member 11	AF010597	Proteína de resistência a drogas	0,83	0,92	0,45*
N-acetiltransferase 2	U17261	Metabolismo de xenobióticos	0,91	1,09	0,47*
Glutathiona-S-transferase, alfa	K01931	Metabolismo de xenobióticos	0,73	1,23	0,50*
Transportador anionico	D79981	Transporte	0,70	0,94	0,50*
Canal de potássio, membro 2	M77482	Canal iônico	0,82	0,86	0,44*

* Genes hipoexpressos

** Genes hiperexpressos

Tabela 10: continuação

Gene	Genbank	Classificação Funcional	A/N	C/A	R/A
Canal de potássio, membro 6	X17621	Canal iônico	1,03	0,71	0,42*
Proteína ligante de retinol celular 2	NM_012640	Não Classificado	0,50*	1,29	0,76
Carreador de solutos,	U28504	Transporte	0,95	0,69	0,44*
Transportador de aa sódio dependente 2	AJ132846	Transporte	1,12	0,61	0,50*
Cytochrome c oxidase, VIII-H	X64827	Metabolismo	2,17**	0,42*	0,56
Cytochrome C	M20622	Não Classificado	1,76	0,49*	0,59
Ácido graxo sintase	M76767	Metabolismo	2,16**	0,46*	0,57
Esteróide redutase 2	M95058	Metabolismo	2,56**	0,49*	0,56
CYP-P450 3A1	M10161	Metabolismo de xenobióticos	2,00**	1,05	1,01
CYP-P450 4A10	M37828	Metabolismo de xenobióticos	2,41**	0,42*	0,56
Gama-glutamil hidrolase	U38379	Metabolismo de xenobióticos	1,74	0,39*	0,50*
Gama-glutamil Transpeptidase	M33821	Metabolismo de xenobióticos	1,52	0,45*	0,48*
Glutathione redutase	U73174	Metabolismo de xenobióticos	1,31	0,47*	0,48*
Glutathione S-transferase, mu 5	U86635	Metabolismo de xenobióticos	1,10	0,40*	0,55
CYP-P450, 40 (alfa-hidroxilase)	AB001992	Metabolismo de xenobióticos	1,29	0,56	0,49*
Receptor kinase ligado a proteína G	U34841	Não classificado	2,75**	1,10	1,11
Proteína ativada por estresse, alfa II	L27112	Proteína de resposta ao estresse	2,11**	1,27	1,32

* Genes hipoexpressos

** Genes hiperexpressos

O agrupamento hierárquico não supervisionado, utilizando a expressão diferencial dos 31 genes diferencialmente expressos em cólon está representado na figura 18.

Figura 18 Agrupamento hierárquico não supervisionado em amostras de cólon de ratos submetidos à aplicação de DEN e tratados com água (controle-A) comparados a ratos normais (N) e em cólon de ratos submetidos à aplicação de DEN e tratados com couve (C) ou repolho (R), na água de beber (20% p/v), comparados a ratos controle (A). A variação de cores entre o verde e o vermelho representam os genes hiperexpressos (vermelho) e os genes hipoexpressos (verde).

5.11 RT-PCR

5.11.1 Fígado

Os Blots obtidos em análise de RT-PCR para a confirmação da expressão diferencial dos genes selecionado para o fígado estão representados na figura 19.

Figura 19: Resultado do RT-PCR de RNA total de fígado com os primers dos genes que codificam para as enzimas citocromo P-450 19 (CYP 19) e 17 (CYP 17); para a glutathione -S-transferase isoforma pi (GSTpi); oxoguanina-DNA glicosilase 1 (OGG1) e para o gene controle gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Ratos normais (N); água (controle-A); couve (C); repolho (R)

Figura 20: Densitometria das bandas de RT-PCR, valores normalizados pela expressão do gene GAPDH (A). Razão entre ratos submetidos à aplicação de DEN e tratados com água (controle-A) comparados a ratos normais (N) e em fígado de ratos submetidos à aplicação de DEN e tratados com couve (C) ou repolho (R), na água de beber (20% p/v), comparados a ratos controle (A), nas técnicas de RT-PCR (B) e macroarray (C). * Genes hipoeexpressos ($\leq 0,5$).

Apesar de, na análise de RT-PCR, todos os genes apresentarem a mesma tendência encontrada na análise de macroarray, o único gene que foi confirmado como diferencialmente expresso foi o que codifica para a GSTpi, que apresentou-se hipoexpresso em animais tratados com repolho nos dois testes.

Os demais genes que foram encontrados como diferencialmente expressos no macroarray não apresentaram hipo ($\leq 0,50$) ou hiperexpressão (≥ 2) no RT-PCR.

5.11.2 Cólon

Figura 21: Resultado do RT-PCR de RNA total de cólon com os primers dos genes que codificam para as enzimas citocromo P-450 3A1 (CYP3A1); Glutathione redutase (GSR); para a glutathione -S-transferase isoforma AY (GSTAY); Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e para o gene controle gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Ratos normais (N); água (controle-A); couve (C); repolho (R)

Figura 22: Densitometria das bandas de RT-PCR, valores normalizados pela expressão do gene GAPDH (A). Razão entre cólon de ratos submetidos à aplicação de DEN e tratados com água (controle-A) comparados a ratos normais (N) e em cólon de ratos submetidos à aplicação de DEN e tratados com couve (C) ou repolho (R), na água de beber (20% p/v), comparados a ratos controle (A), nas técnicas de RT-PCR (B) e macroarray (C). * Genes hipoeexpressos ($\leq 0,5x$), ** Genes Hiperexpressos ($\geq 2x$)

6 DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos sugerem que um consumo aumentado de frutas e hortaliças está relacionado à redução do risco do desenvolvimento de câncer constituindo, portanto, importante estratégia de saúde pública para controle de neoplasias. Nesse sentido a OMS recomenda o consumo de ao menos 400g de frutas e hortaliças por dia para redução do risco do desenvolvimento de câncer (OMS, 2002).

Existem evidências de que as *Brassicas* protegem contra várias classes de carcinogênicos reativos com o DNA (STEINKELLNER, 2001). No presente trabalho, no protocolo experimental I avaliou-se o eventual potencial quimiopreventivo da couve e do repolho, quando adicionados a 10% (p/v) na água de beber de ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de “Ito”.

Inicialmente verificou-se não haver diferença no crescimento, consumo de ração ou de líquido dos animais dos grupos C e R quando comparados ao grupo A, sugerindo a adequação da suplementação aos animais. Diante desses resultados prosseguimos com as análises para avaliação de quimioprevenção.

Não foi observada redução do número ou da área ocupada por LPN hepáticas GST-P positivas em animais tratados com couve ou repolho. O tamanho das LPN hepáticas GST-P positivas geralmente é descrito como reflexo da magnitude da fase de promoção da hepatocarcinogênese, e o número de lesões está relacionado à intensidade do processo de iniciação (SAWAKI *et al.*, 1998). Por essa razão, pode-se afirmar que nas presentes condições experimentais as hortaliças *Brassicas* couve e repolho apresentaram não apresentaram efeitos durante as fases de iniciação ou promoção da carcinogênese hepática, em um estágio que pode ser considerado como de recente promoção, pois as LPN GST-P positivas

apresentaram pequeno tamanho. Esses resultados também mostram que as hortaliças couve e repolho, não potencializaram a carcinogênese.

Muitos estudos (a maioria *in vitro*) com hortaliças *Brassicac*, ou seus compostos isolados (especialmente os ITC), são controversos, apresentando ausência de efeitos, promoção ou supressão da carcinogênese (VERHOEVEN *et al.*, 1997; TANAKA *et al.*, 1990). O tratamento de ratos com couve de Bruxelas ou repolho roxo na concentração de 5% (v/v) na água de beber, antes e após a administração do carcinógeno IQ, resultou em redução de LPN hepáticas. Esse efeito ocorreu durante as etapas de iniciação e promoção da carcinogênese (KASSIE *et al.*, 2003). Entretanto, as mesmas hortaliças quando administradas da mesma forma, em período após a aplicação do carcinógeno não apresentaram efeitos em LPN hepáticas, o que sugere que as hortaliças apresentam efeito apenas se fornecidas em período pré-iniciação (UHL *et al.*, 2004).

Também vale destacar que alguns metabólitos dos glicosinolatos são relacionados com a promoção do tumor em vários órgãos em roedores experimentais (DASHWOOD, 2002).

A ausência de efeito protetor da couve e do repolho com relação à LPN positivas para GST-P pode estar relacionada ao tempo de suplementação antes da aplicação do carcinógeno. Existe a possibilidade de que essas hortaliças sejam efetivas se administradas por longo período antes da iniciação ou em doses superiores a administrada. Em alguns trabalhos, observa-se, por exemplo, o fornecimento de 20 a 25% de vegetais desidratados na ração dos animais (SALBE & BJEDANES, 1985; WORTELBOER, 1992). Outra possibilidade é que as *brassicac* tenham efeitos quimiopreventivos em outros órgãos que não o fígado.

Muitos mecanismos são sugeridos como responsáveis pelos efeitos anticarcinogênicos das hortaliças *Brassicac*, incluindo a indução da apoptose (KECK & FINLEY, 2004). *In vitro*, ITC iduziram a apoptose em cultura de

células de câncer (KUANG & CHEN, 2004). Em um dos poucos estudos *in vivo* que avaliou a indução da apoptose por hortaliças *Brassicas*, ratos iniciados com 1,2-dimetilhidrazina e tratados com couve de Bruxelas apresentaram aumento da apoptose em cólon (SMITH *et al.*, 2003). Compostos presentes com exclusividade nas hortaliças da família das *Brassicas* como os glicosinolatos e os seus produtos de degradação, ITC e indóis, apresentaram indução da apoptose em cultura de células humanas de câncer de pulmão (KUANG, 2004). Contudo, efeitos semelhantes não foram observados na hepatocarcinogênese. Quando avaliado o índice apoptótico em LPN e no tecido ao redor das LPN, no presente experimento, não houve indução da apoptose. Considerando que a indução de apoptose quantificada em tecidos alvo pode ser utilizada como biomarcador do potencial quimiopreventivo (SAMAH, 2007), esses resultados confirmam a ausência de efeitos inibitórios das hortaliças *brassicas* observada nas LPN hepáticas.

Muitos estudos dão ênfase aos glicosinolatos e seus produtos de degradação como os principais compostos responsáveis pelos efeitos biológicos das hortaliças *Brassicas* (TALALAY & FAHEY, 2001; KIM & MILNER, 2005). Entretanto essas hortaliças são uma matriz complexa com presença de muitos outros CBA, incluindo a luteína. A couve e o repolho apresentam 12,6 e 3,3 mg/100g de luteína, respectivamente (KRUK, 2005). Podemos assumir que a ingestão aproximada de luteína pelos animais experimentais tratados com couve ou repolho foi respectivamente de 0,21 e 0,05mg/100g considerando o valor médio de consumo de líquido.

A luteína é um carotenóide com importante capacidade antioxidante e pode ser depositada e armazenada em tecidos corporais como o fígado. Por essa razão quantificou-se a luteína hepática dos animais e observou-se um aumento da concentração desse carotenóide em ratos tratados com couve ou repolho quando comparados ao grupo normal, indicando a efetiva absorção e acúmulo de luteína no fígado desses animais. A concentração hepática de luteína do grupo couve foi elevada quando comparada ao grupo

repolho, o que era esperado, pois a couve apresenta maior quantidade de luteína em sua composição.

Muitos estudos sugerem que frutas e hortaliças podem reduzir danos em DNA, causados por intermediários eletrofílicos de pró-carcinogênicos ou radicais livres e que esse efeito pode proteger contra o câncer (POOL-ZOBEL *et al.*, 1997).

Por ser a luteína um carotenóide com potente capacidade antioxidante (DWYER *et al.*, 2001), e o estresse oxidativo representar um importante papel durante as fases de iniciação, promoção e progressão da carcinogênese, optou-se por avaliar os efeitos da couve e do repolho em danos de “quebra” em DNA, induzidos *ex vivo* por H₂O₂ em tecido hepático. O DNA hepático dos animais submetidos ao modelo de “Ito” e tratados com as hortaliças couve ou repolho apresentaram os “cometas”, formados pela migração do DNA submetido à eletroforese, com comprimento menor ($P < 0,05$), que os animais não tratados, sugerindo uma possível ação antioxidante e protetora das hortaliças couve e repolho.

Pesquisadores sugerem relação direta entre a ingestão de luteína e a redução de danos oxidativos em linfócitos humanos (COLLINS *et al.*, 1998) e entre a redução de danos em DNA hepático (TOLEDO *et al.*, 2003). Sugere-se que a luteína pode ser o CBA responsável pelo efeito protetor das hortaliças couve e repolho encontrado no teste do cometa, porém a hipótese de que outros compostos presentes nas hortaliças, como glicosinolatos e compostos fenólicos, podem estar relacionados não pode ser descartada.

Diante dos resultados do experimento I, onde observou-se efeitos protetores das hortaliças couve e repolho, quando fornecidas a concentração de 10% na água de beber, contra danos em DNA induzidos *ex vivo* por H₂O₂, seguiu-se para a avaliação *in vivo* dos efeitos dessas hortaliças em danos provocados pela DEN. No segundo experimento foram avaliados os efeitos das hortaliças *Brassicas* couve e repolho, quando fornecidas à concentração

de 20% (p/v) na água de beber de ratos Wistar, com relação a danos causados em fígado de ratos pela DEN, considerada um potente carcinogênico hepático, bem como na expressão diferencial de genes.

A exemplo do primeiro experimento, não houve diferença ($P>0,05$) com relação ao peso inicial e final, peso relativo do fígado, consumo de ração e de líquido entre os grupos. Isso sugere a adequação da suplementação de couve e repolho na concentração de 20% (p/v), e a ausência de efeitos tóxicos aparentes.

As nitrosaminas e os seus mecanismos de ação atraem a atenção de muitos pesquisadores, pois a presença destes compostos em alimentos é considerada um fator de risco por suas implicações em cânceres relacionados ao trato gastrointestinal, como faringe, esôfago, estômago, pâncreas, cólon e reto e fígado (GARCIA-GASCA, *et al.*, 1998). As nitrosaminas podem ser mutagênicas ou carcinogênicas. Um dos mecanismos pelo qual elas agem é a formação de radicais livres ou intermediários eletrofílicos reativos com o DNA, formando adutos o que pode causar mutações (COLLINS, 2005). Por essa razão, quantificou-se a base de DNA modificada, 8-OHdG, um aduto amplamente utilizado como biomarcador para avaliação de danos oxidativos em DNA.

A comparação do grupo controle (A) com o grupo normal (N), foi realizada com o objetivo de avaliar a influência da DEN na formação do aduto 8-OHdG. Em 1997 Nakae *et al.* descreveram que a formação de 8 OHdG tem concentração máxima em DNA hepático 24h após a aplicação da DEN, e que essa formação ocorre em quantidades significativas na dose de 20 mg/Kg. De forma semelhante, no presente experimento, foi encontrada quantidade aumentada de 8-OHdG em animais do grupo A quando comparados ao grupo N, demonstrando que a DEN pode exercer a sua carcinogenicidade via formação desse aduto.

Foi encontrada elevada concentração de 8-OHdG em animais tratados com repolho quando comparado aos grupos controle e couve. Alguns experimentos demonstraram que ITCs, podem apresentar efeitos genotóxicos, como mutações pontuais e danos reparáveis em DNA de bactérias, e efeitos clastogênicos em células de mamíferos *in vitro* (MUSK & JOHNSON, 1992; 1993).

Kassie *et al.* (1996) testaram se as hortaliças *Brassicaceae* apresentavam efeito genotóxico como os demonstrados *in vitro*, para os ITC. Eles utilizaram dois modelos, um de bactérias e outro de cultura de células de mamíferos, e incubaram as células e as bactérias com suco de hortaliças crucíferas dentre elas o repolho, e hortaliças não crucíferas, como a cenoura. O maior número de mutantes foi encontrado nas células tratadas com couve de Bruxelas e repolho. Os autores concluíram que as hortaliças *brassicaceae* contêm compostos que podem causar mutações pontuais, danos reparáveis em DNA, indução de aberrações cromossômicas e troca de cromátides irmãs em cultura de células de mamíferos. Os efeitos foram observados na ausência de ativação metabólica e podem ser atribuídos a uma ação direta de genotoxinas. Os resultados em bactérias evidenciam que esses compostos induzem a substituição de bases de DNA, o que pode levar a mutação. Como esses efeitos foram observados apenas para as hortaliças *brassicaceae*, supõe-se que seja devido à presença de glicosinolatos, que são constituintes específicos das plantas dessa família.

Steinkellner, *et al.* (2001), em uma revisão sobre hortaliças *brassicaceae* e carcinogênicos, descreve que em alguns estudos o indol-3-carbinol e outros ITC causaram promoção do crescimento do tumor, e alguns ITC ainda levaram a formação de aberrações cromossômicas em experimentos *in vivo*.

Uma dieta com teores elevados de glicosinolatos foi apontada como responsável por vários efeitos tóxicos observados em animais de laboratório, tais como retardo no crescimento, lesões e necrose no fígado, e hipertrofia ou

hiperplasia da tireóide. Os animais que apresentaram essas características consumiram cerca de 2-5 mg de glicosinolatos por grama de dieta. Efeitos adversos também são encontrados em dietas com apenas 0,5 mg de glicosinolatos (STOEWSAND, 1995). Contudo, no presente experimento a ingestão média de glicosinolatos foi de 0,005 mg e 0,02 mg/100g de p.c. para os grupos que receberam couve e repolho, respectivamente, ou seja, abaixo dos níveis descritos como prejudiciais na literatura.

Com relação ao teste do cometa, ao contrário do experimento I, não houve proteção do DNA no experimento II. É importante ressaltar que no experimento I, os danos em DNA foram induzidos *ex vivo* por H₂O₂, ao passo que no experimento II, os danos foram resultantes da aplicação de uma dose baixa de DEN. É possível que as hortaliças apresentem efeito apenas como antioxidantes diretas, neutralizando EROs, e não apresentem a capacidade de reduzir danos causados por agentes carcinogênicos. Isso pode ser entendido como uma ineficiência das hortaliças couve e repolho na redução da iniciação da carcinogênese química. Essa hipótese é corroborada pela observação da ausência de efeitos na redução de LPN hepáticas observadas no experimento I.

Apesar do aumento da concentração de 8-OHdG, não encontramos diferenças significativas com relação a instabilidade do DNA hepático avaliada pelo método do cometa alcalino, que avalia danos de “quebra” em DNA. Esse resultado aumenta a possibilidade de que os danos encontrados em DNA possam ser apenas do tipo reparáveis, e não alterem a estabilidade do mesmo.

A relação entre o câncer e fatores nutricionais, envolve a modulação da expressão de genes específicos. (ROCK *et al.*, 2000). A técnica de *macroarray* é uma importante ferramenta para análise de expressão gênica. Consiste em uma análise semi-quantitativa que permite um *screening* do panorama geral dos níveis dinâmicos de expressão gênica de um número

limitado de genes (centenas de genes) que podem estar em andamento durante diferentes tratamentos *in vivo* ou *in vitro*.

As enzimas metabolizadoras de xenobióticos têm um importante papel na ativação e destoxificação de compostos deletérios ao organismo, incluindo carcinógenos. As hortaliças *Brassicaceae* apresentam a capacidade de modular a expressão de várias enzimas relacionadas ao metabolismo de xenobióticos (STAACK *et al.*, 1998; LAMPE *et al.*, 2000) e de enzimas antioxidantes em roedores e humanos (VANG *et al.*, 1999). Um dos mecanismos de quimioprevenção dos ITC é o aumento da expressão e atividade das enzimas destoxicadoras de xenobióticos, especialmente a glutathione S-transferase (GST) (MUNDAY & MUNDAY, 2004). Sorensen *et al.* (2001) encontraram aumento de expressão em genes da GST e da quinona redutase em fígado de ratos tratados com couve de Bruxelas, e relacionaram esses efeitos com as atividades quimiopreventivas dessa hortaliça.

A análise de *macroarray* revelou 29 genes diferencialmente expressos no fígado. Resultados interessantes foram encontrados em animais tratados com repolho. Houve hipoeexpressão de um gene responsável por uma das isoformas da GST, quando comparado ao grupo controle e ao grupo tratado com couve. O aumento da expressão dessa enzima é relacionado à reduzida susceptibilidade à carcinogênese química (MUNDAY & MUNDAY, 2004).

O gene que codifica para a 8-oxoguanina-DNA-glicosilase (OGG) também foi encontrado hipoeexpresso. Essa enzima é responsável pela excisão da 8-OHdG do DNA (KUSHIDA, 2005). A quantidade aumentada de 8-OHdG encontrada no DNA de animais tratados com repolho pode estar relacionada à inibição da OGG. Em ratos tratados com extrato de couve de Bruxelas, foi observada ausência de efeitos com relação à expressão da OGG, contudo os autores observaram um aumento de 8-OHdG em DNA hepático (Sorensen *et al.*, 2001).

As enzimas do citocromo P450 são uma superfamília de enzimas responsáveis por ativar substratos, e são induzidas por carcinogênicos químicos e CBA (ROCK *et al.*, 2000). Os animais do grupo repolho apresentaram hipoexpressão em dois genes CYP 450, o que pode ser considerado um efeito positivo. Sorensen *et al.* (2001) encontraram aumento de expressão em genes da GST e da quinona redutase, porém observaram ausência de efeitos em genes da OGG, e de três isoformas de CYPs em fígado de ratos tratados com couve de Bruxelas. Outros autores encontraram aumento na expressão de CYPs em ratos tratados com ITC (TALALAY & FAHEY, 2001). Uma hipótese para explicar a falta de repetibilidade de resultados entre os grupos de pesquisa é a diferença na composição de glicosinolatos entre as hortaliças testadas.

O cólon tem contato direto com os alimentos e está exposto à elevada quantidade de CBA, que não precisam necessariamente ser absorvidos para exercer algum efeito nesse órgão. Além disso, a ingestão aumentada de alimentos com altos teores de luteína é associada à redução do risco do desenvolvimento de câncer de cólon em humanos (SLATERRY *et al.*, 2000). Por estas razões optou-se por realizar a análise da expressão diferencial de genes de cólon dos ratos.

Trinta e um genes foram diferencialmente expressos no cólon. Utilizou-se a comparação de ratos controle (A) e ratos normais (N) para observar os efeitos da DEN na expressão diferencial de genes. Achados interessantes nessa comparação foram o aumento da expressão de duas isoformas de CYPs, ativadoras de xenobióticos e de uma proteína ativada por estresse, provavelmente provocado pela aplicação da DEN.

O tratamento com repolho reduziu a expressão de cinco genes de enzimas metabolizadoras de xenobióticos de fase II (destoxificadoras), dentre eles três referentes à isoformas da GST. Contudo, nesse grupo, dois

oncogenes e o antígeno de proliferação nuclear foram hipoexpressos. Esses resultados confirmam o efeito antagônico observado no fígado.

Com relação ao grupo tratado com couve encontramos uma isoforma de CYP hipoexpressa. De maneira interessante esse gene está hiperexpresso no grupo A, o que pode ser relevante para uma possível interferência na ação da DEN, mediada por CBA presentes na couve. Entretanto nesse grupo também encontramos 4 genes referentes a enzimas de fase II hipoexpressos.

É interessante reafirmar que a análise de expressão diferencial de genes é semi-quantitativa. Por essa razão é necessária a confirmação dos genes de interesse e apontados como diferencialmente expressos por técnicas quantitativas.

7 Considerações Finais

A administração de couve ou repolho (10% p/v) na água de beber, durante oito semanas consecutivas, a ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de “Ito”, em período compreendendo as etapas de iniciação e promoção da carcinogênese, não resultou em atividades quimiopreventivas. Isso foi evidenciado pela análise morfométrica de LPN GST-P positivas pela ausência de indução da apoptose em LPN hepáticas.

O tratamento com couve ou repolho (10% p/v) na água de beber de ratos Wistar resultou em proteção contra danos induzidos *ex vivo* por H₂O₂ em DNA hepático. Esse efeito pode estar relacionado com a luteína, pois a concentração hepática deste carotenóide apresentou níveis elevados em animais tratados com as hortaliças.

A aplicação de DEN (20mg/Kg) via i.p. resultou em elevação das concentrações de 8-OHdG em DNA hepático de ratos que receberam o agente carcinogênico, quando comparados a ratos normais. Esse efeito era esperado por ser a DEN um agente genotóxico com capacidade de induzir danos em DNA.

O fornecimento de repolho (20% p/v) na água de beber induziu a formação de adutos de DNA (8-OHdG) em tecido hepático de ratos Wistar. Contudo os animais que receberam couve (20% p/v) na água de beber não apresentaram aumento na formação de adutos, quando comparados ao grupo controle. Esse efeito pode ser relacionado a hipoeexpressão do gene que codifica para a OGG, verificada apenas no grupo que recebeu repolho, e esse efeito pode ser atribuído ao conteúdo de glicosinatos do repolho, encontrado quase três vezes o valor da couve.

Apesar do DNA hepático de ratos tratados com couve ou repolho (10% p/v) na água de beber apresentar proteção contra danos induzidos *ex vivo* por

H₂O₂, o tratamento com couve ou repolho (20% p/v) não apresentou inibição de danos induzidos por DEN. Entretanto, também não foi observada a indução de danos em nenhum dos grupos experimentais.

As hortaliças couve ou repolho (20% p/v) apresentam a capacidade de modular a expressão de genes relacionados a diferentes categorias funcionais, de maneira contraditória. Nem todos os genes influenciados favorecem a quimioprevenção.

Em resumo, é possível afirmar que as hortaliças *Brassic*as, couve e repolho apresentaram efeitos benéficos e adversos. Possíveis respostas para esses efeitos controversos podem ser a diferença na composição e concentração de glicosinolatos/ITC nas hortaliças e a quantidade de hortaliças que são consumidas.

REFERÊNCIAS

- AMES, B.N.; GOLD, L.S.; and WILLET, W.C. The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.92, p.5258-5265, 1995.
- ARNAUD, J.; FORTIS, I.; BLACHIER, S.; KIA, D.; FAVIER, A. Simultaneous determination of retinol, alfa-tocopherol and beta-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* v.572, p.103-116, 1991.
- BAIK, S.C.; YOUN, H.S.; CHUNG, M.H. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori* and risk of gastric mucosa. *Cancer Research*, v.56, p.1279-1282, 1996.
- BARBISAN, L.F.; SCOLASTICI, C.; MIYAMOTO, M.; SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F.; CAMARGO, J.L.V. Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and on rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Genetics and Molecular Research*, v.2, p.295-308, 2003.
- BARCELO, S.; GARDINER, J.M.; GESHER, A. and CHIPMAN, J.K. CYP2E1-mediated mechanism of anti-genotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane. *Carcinogenesis*, v.17, p.277-282, 1996.
- BARUA, A.B.; KOSTIC, D.; OLSON, J.A. New simplified procedures for the extraction and simultaneous high-performance liquid chromatography analyses of retinal, tocopherols and carotenoids in human serum. *Journal of Chromatography A* v.617, p.257-264, 1991.
- BEN-AMOTZ, A.; FISHLER, R. Analysis of carotenoids with emphasis on 9-cis β -carotene in vegetables and fruits commonly consumed in Israel. *Food Chemistry*, v.62, p.515-520, 1998.
- BENNETT, R.N.; MELLON, F.A.; ROSA, E.A.; PERKINS, L.; KROON, P.A. Profiling glucosinolates, flavonoids, alkaloids, and other secondary metabolites in tissues of *Azima tetraantha* L. (Salvadoraceae). *Journal of Food Chemistry*, v. 52 (19), p.5856-6862, 2004.
- BROWN, J.L. N-Nitrosamines. *Occupational Medicine*, v.14, p.839-848 1999.
- CANISTRO, D.; DELLA CROCE, C.; IORI, R.; BARILLARI, J.; BRONZETTI, G.; POI, G.; CINI, M.; CALTAVUTURO, L.; PEROCCO, P. and PAOLINI, M. Genetic and metabolic effects of gluconasturtiin, a glucosinolate derived from cruciferae. *Mutation Research*, v.545, p.23-35, 2004.
- CHEN, C.; KONG, A.N.T. Dietary cancer chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *TRENDS in Pharmacological Science*, v.26, n.6, p.318-326, 2005.

- CHU, Y.-F.; SUN, J.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Food and Agricultural chemistry*, v.50, p.6910-6916, 2002.
- COHEN, J.H.; KRISTAL, A.R. Stanford, fruit and vegetable intake and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, v.92, p. 61-68, 2000.
- COLLINS, A.R. Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. *European Journal of Cancer*, v.41, p.1923-1930, 2005
- COLLINS, A.R.; OLMEDILA, B.; SOUTHON, S.; GRANADO, F.; DUTHIE, S.J. Serum carotenoids and oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, v.19 (12), p.2159-2162, 1998.
- COLUMBANO, G.M.L.; PERRA, A.; LOI, R.; SHINOZUKA, H.; COLUMBANO, A. Cell proliferation induced by triiodothyronine in rat liver is associated with nodule regression and reduction of hepatocellular carcinomas. *Cancer Research*, v.60, p.603-609, 2000.
- COOKE, M.S.; EVANS, M.D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *The FASEB Journal*, v.17, p.1195-1214, 2003.
- DASHWOOD, R.H. Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an 'A-to-Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. *Mutation Research*, v.511, p.89-112, 2002.
- DAS, S.; TYAGI, A.K.; KAUR, H. Cancer modulation by glucosinolates: a review. *Current Science*, v.79, n.12, p.1665-1671, 2000.
- DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer; quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute*, v.66, p.1191-1308, 1981.
- DWYER, J.H.; NAVAB, M.; DWYER, K.M.; HASSAN, K.; SUN, P.; SHIRCORE, A.; HAMA-LEVY, S.; HOUGH, G.; WANG, X.; DRAKE, T.; MERZ, N.B.; FOLGEMAN, A.M. Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles atherosclerosis study. *Circulation*, v.19, p.2921-2927, 2001.
- ESPÍNDOLA, R.M.; MAZZANTINI, R.P.; ONG TP, CONTI A, HEIDOR R, MORENO FS. Geranygeraniol and β -ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cells proliferation, total plasma cholesterol and DNA damage during initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF- κ B activation. *Carcinogenesis*, v.26, p.1091-1099, 2005.
- FAROMBI, E.O.; MOLLER, P.; DRAGSTED, L.O. *Ex-vivo* and *in-vitro* protective effects of kolaviron against oxygen-derived radical-induced DNA damage and oxidative stress in human lymphocytes and rat liver cells. *Cell Biology and Toxicology*, v. 20, p.71-82, 2004.

FENWICK, G.R.; HEANY, R.K. Glucosinolates and their breakdown products in cruciferous crops, foods and feedingstuffs. *Food Chemistry*, v.11, p.249-271, 1983.

FEO, F.; PASCALE, R.M.; SIMILE, M.M.; DE MIGLIO, M.R.; MURONI, M.R.; CALVISI, D. Genetic alterations in liver carcinogenesis: implications for new preventive and therapeutic strategies. *Critical Reviews in Oncology*, v.11, p.19-62, 2000.

FINLEY, J.W. Proposed criteria for assessing the efficacy of cancer reduction by plant foods enriched in carotenoids, glucosinolates, polyphenols and selenocompounds. *Annals of Botany*, v.123, p.1-22, 2005.

FONSECA, E.L.A.V.; CHAGAS, C.E.; MAZZANTINI, R.P.; HEIDOR, R.; ONG, T.P.; MORENO, F.S. All-trans and 9-cis retinoic acids, retinol and β -carotene chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve distinct actions on glutathione S-transferase positive preneoplastic lesions remodeling and DNA damage. *Carcinogenesis* 26, 1940-1946, 2005.

FORMAN, M.R.; HURSTING, S.D.; UMAR, A.; BARRETT, J.C. Nutrition and cancer prevention: a multidisciplinary perspective on human trials. *Annual Reviews in Nutrition*, v.24, p.223-254, 2004.

GARCÍA-GASCA, T.; FATELL, S.; VILLA-TREVINO, S. and MEJIA, E.G. Effect of carotenoids against genotoxicity of diethylnitrosamine on rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, v.12, p.691-698, 1998.

GRASL-KRAUPP, B.; BURSCH, W.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; WAGNER, A.; LAUER, B. and SHULTE-HERMANN, R. Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes Carcinogenesis in rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.91, p.9995-9999, 1994.

GREAVES, M. Cancer causation: the darwian dowside of past success. *Lancet Oncology*, v.3, p.244-251, 2002.

GREENWALD, P.; CLIFFORD, C.K. and MILNER, J.A. Diet and cancer prevention. *European Journal of Cancer*, v.37, p.948-965, 2001.

HAIR, J.F.Jr., ANDERSON, R.E., TATHAM, R.L., BLACK, W.C. *Multivariate Data Analysis*. 5 ed. New Jersey: Prentice- Hall, 1998. 730 p.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. In 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, v.18, p.45-51, 2003.

IARC. Word Cancer report. STEWART, B. W.; KLEIHUES, P. ed. IARC Press/Oxford University Press, 2002.

ICHIBA, M.; MAETA, Y.; MUKOYAMA, T.; SAEKI, T.; YASUI, S.; KANBE, T.; OKANO, J-I.; TANABE, Y.; HIROOKA, Y.; YAMADA, S.; KURIMASA, A.;

- MURAWAKI, Y.; SHIOTA, G. Expression of 8-hydroxy-2'-deoxyuanosine in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Liver International*, v.23, p.338-345, 2003.
- IMAIADA, K.; SHIRAI, T.; TATEMATSU, M.; TAKANO, T.; ITO, N. Dose responses of five hepatocarcinogens for the initiation of rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters*, v.14, p.279-283, 1981.
- INCA. Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil. 94p, 2005.
- IRIE, M.; TAMAE, K.; TANAKA, N.I.; KASAI, H. Occupational and lifestyle factors and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Science*, v.96, n.9, p.600-606, 2005.
- ITO, N.; HASEGAWA, R.; IMAIADA, K.; HIROSE, M.; SHIRAI, T.; TAMANO, S.; HAGIWARA, A. Medium-term rat liver bioassay for rapid detection of hepatocarcinogenic substances. *Journal of Toxicology and Pathology*, v.10, p.1-11, 1997.
- ITO, N.; IMAIADA, K.; ASAMOTO M.; SHIRAI, T. Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rat. *Mutation Research*, v.462, p.209-217, 2000.
- ITO, N.; TAMANO, S. and SHIRAI, T. A medium-term rat liver bioassay for rapid *in vivo* detection of carcinogenic potential of chemicals. *Cancer Science*, v. 94, n.1, p.3-8, 2003.
- ITO, N.; TSUDA, H.; TATEMATSU, M.; INOUE, T.; TAGAWA, Y.; AOKI, T.; UWAGAWA, S.; KAGAWA, M.; OGISO, T.; MASUI, T.; IMAIADA, K.; FUKOSHIMA, S. and ASAMATO, M. Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats-an approach for a new medium term bioassay system. *Carcinogenesis*, v.9, p.387-394, 1988.
- JAIN, M.G.; HISLOP, G.T.; HOWE, G.R.; GHADIRIAN, P. Plant foods, antioxidants and prostate cancer risk: findings from case-control studies in Canada. *Nutrition and Cancer*, v.34, p.173-184, 1999.
- KAPISZEWSKA, M. A vegetable to meat consumption ratio as a relevant factor determining cancer preventive diet. The Mediterranean versus other European countries. *Forum of Nutrition*, v.59, p.130-153, 2006.
- KASSIE, F.; PARZEFALL, W.; MUSK, S.; JOHNSON, I.; LAMPRECHT, G.; SONTAG, G.; KNASMULLER, S. Genotoxic effects of crude juices from *Brassica* vegetables and juices and extracts from phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin n bacterial and mammalian cells. *Chemico-Biological Interations*, v. 102, p.1-16, 1996.
- KASSIE, F.; UHL, M.; RABOT, S.; GRASL-KRAUPP, B.; VERKERK, R.; KUNDI, M.; CHABICOVSKY, M.; SCHULT-HERMANNM, R.; KNASMÜLLER, S. Chemoprevention of 2-amino-3-methylimidazo[4-5-f]quinoline (IQ)-induced colonic and hepatic preneoplastic lesions in the F344 rat by cruciferous vegetables

administered simultaneously with the carcinogen. *Carcinogenesis*, v.24, p.255-261, 2003.

KEARNEY, M.; BRADBURY, C.; ELLAHI, B.; HODGSON, M.; THURSTON, M. Mainstreaming prevention: Prescribing fruit and vegetables as a brief intervention in primary care. *Public Health*, v.119, p.981-986, 2005.

KECK, A.S.; FINLEY, J.W. Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integrative Cancer Therapies*, v.3, p.5-12, 2004.

KENSLER, T.W.; CHEN, J.G.; EGNER, P.A.; FAHEY, J.W.; JACOBSON, L.P.; STEPHENSON, K.K.; YE, L.; COADY, J.L.; WANG, J.B.; WU, Y.; SUN, Y.; ZHANG, Q.N.; ZHANG, B.C.; ZHU, Y.R.; QIAN, G.S.; CARMELLA, S.G.; HECHT, S.S.; BENNING, L.; GANGE, S.J.; GROOPMAN, J.D.; TALALAY, P. Effects of glucosinolate-rich broccoli sprouts on urinary levels of aflatoxin-DNA adducts and phenanthrene tetraols in a randomized clinical trial in He Zuo Township, Qidong, people's Republic of China. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v.14, p.2605-2613, 2005.

KIM, Y.S.; MILNER, J.A. Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, v.16, p.65-73, 2005.

KING, K.L.; CIDLWOSKI, J.A. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual Reviews in Physiology*, v.60, p.601-617, 1998.

KOLONEL, L.N.; HANKIN, J.H.; WHITTEMORE, A.S.; WU, A.H.; GALLAGHER, R.P.; WILKENS, L.R.; JOHN, E.M.; HOWE, G.R.; DREON, D.M.; WEST, D.W. and PAFFENBERGER, R.S. Vegetables, fruits, legumes and prostate cancer: a multicenter case-control-study. *Cancer Epidemiology Biomarker & Prevention*, v.9, p.795-804, 2000.

KRUK J. Occurrence of chlorophyll precursors in leaves of cabbage heads – the case of natural etiolation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v.80, p.187-94, 2005.

KUANG, Y.-F., CHEN, Y.-H. Induction of apoptosis in a non-small cell human lung cancer cell line by isothiocyanates is associated with P53 and P21. *Food Chemistry and Toxicology*, v.42, p.1711-1718, 2004.

KUSHAD, M.M.; BROWN, A.F.; KURILICH, A.C.; JUVIK, J.A; KLEIN, B.P.; WALLING, M.A. and JEFFERY, E.H. Variation of glucosinolates in vegetables crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.47, p.1541-1548, 1999.

KUSHAD, M.M.; CLOYD, R. and BABADOOST, M. Distribution of glucosinolates in ornamental cabbage and kale cultivars. *Science Horticulturae*, v.101, p.215-221, 2004.

LAMPE, J.W. Spicing up a vegetarian diet: chemopreventive effects of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.78, p.579S-583S, 2003.

- LEE, B.M.; LEE, S.K.; KIM, H.S. Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, betacarotene and red ginseng). *Cancer Letters*, v.132, p.249-254, 1998.
- LEE, B.M.; PARK, K.K. Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. *Mutation Research*, v.523-524, p.265-278, 2003.
- LOFT, S.; POULSEN, H.E. Estimation of oxidative damage in man from urinary excretion of repair products. *Acta Biochemistry Polonica*, v.45, p.133-144, 1998.
- LÖW-BASELLI, A.; HUFNAGL, H.; PARZEFALL, W.; SCHULTE-HERMANN, R.; GRASL-KRAUPP, B. Initiated rat hepatocytes in primary culture: a novel tool to study of alterations in grown control during the first stage of carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v.21, p.79-86, 2000.
- MAGEE, P.N. and FARBER, E. Toxic liver injury and carcinogenesis: methylation of liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo. *Biochemistry Journal*, v.83, p.114-124, 1962.
- MARNETT, L.J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, v.21, p.361-370, 2000.
- MICHAUD, D.S.; SPIELGEMAN, D.; CLINTON, S.K.; RIMM, E.B.; WILLET W.C. and GIOVANNUCCI, E.L. Fruit and vegetable intake of bladder cancer in a male prospective cohort. *Journal of the National Cancer Institute*, v.91, n.7, p.605-613, 1999.
- MIZUSHIMA, Y.; KAN, S.; YOSHIDA, S.; SASAKI, S.; AOYAMA, S.; NISHIDA, T. Changes in urinary levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine due to aging and smoking. *Geriatrics and Gerontology International*, v.1, p.52-55, 2001.
- MORENO, F.S.; TOLEDO, L.P.; CONTI, A.; HEIDOR, R.; JORDÃO, A.A.; VANUCCHI, H.; CARDOZO, M.T.; ONG, T.P. Lutein presents suppressing but not blocking chemopreventive activity during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis and this involves inhibition of DNA damage. *Chemico Biological Interactions*, in press, 2007.
- MUNDAY, R.; MUNDAY, C.M. Induction of phase II detoxification enzymes in rats by plant-derived isothiocyanates: comparison of allyl isothiocyanate with sulforaphane and related compounds. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, v.52, p.1857-1871, 2004.
- MUSK, S.R.R.; JOHNSON, I.T. *In vitro* genetic toxicity testing of isothiocyanates in the human diet. *Mutagenesis* v.7, p.383, 1992.
- MUSK, S.R.R.; JOHNSON, I.T. The clastogenic effects of isothiocyanates. *Mutation Research*, v.300, p.111-117, 1993.

NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, L.M.; CIOCCA, D.R. A silver staining method for single-cell gel assay. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v.49, 1183-1186, 2001.

NAKAE, D.; KOBAYASHI, Y.; AKAI, H.; ANDOH, N.; SATOH, H.; OHASHI, K.; TSUTSUMI, M.; KONISHI, Y. Involvement of 8-hydroxyguanine formation in the initiation of rat liver carcinogenesis by low dose levels of N-nitrosodiethylamine. *Cancer Research*, v.57, n.7, p.1281-1287, 1997.

NEMETH, A.; NADASI, E.; GYONGYI, Z.; OLASZ, L.; NYARADY, Z. Early effects of different cytostatic protocols for head and neck cancer on oncogene activation. *Anticancer Research*, v.23, p.4831-4835, 2003.

Ninth plenary meeting, 25 May 2005 –Committee B, third report. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/media/news/WHA58%2022-en.pdf>. Acesso em 09 Jun 2007.

NISHIKAWA, A; MORSE, M.A. and CHUNG, F.L. Inhibitory effects of 2-mercaptoethane sulfonate and 6-phenylhexyl isothiocyanate on urinary bladder tumorigenesis in rats induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Cancer Letters*, v.193, p.11-16, 2003.

NURSE, P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell*, v.79, p.547-550, 1994.

OLIVEIRA, J.E.D.; MARCHINI, J.S. . In *Genômica* Mir, L.: Nutrologia, saúde e genômica nutricional. Nutrigenômica. São Paulo, Atheneu, p.819-830, 2004.

OMS. The world health report 2002. WHO, 2002.

OMS. Cancer control: knowledge into action, WHO guide for effective programmes. Disponível em <http://www.who.int/cancer/publications>. Acesso em 01 Jun 2007.

PAOLINI, M.; NESTLE, M. Pitfalls of enzyme-based molecular anticancer dietary manipulations: food for thought. *Mutation Research*, v.543, p.181-189, 2003.

PARK, E.J.; PEZZUTO, J.M. Botanicals in cancer prevention. *Cancer and Metastasis Reviews*, v.21, p.231-255, 2002.

PARK, J.-H.; GOPISHETTY, S.; SZEWCZUK, L.M.; TROXEL, A.B.; HARVEY, R.G.; PENNING, T.M. Formation of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-Oxo-dGuo) by PAH o-quinones: Involvement of reactive oxygen species and copper(II)/copper(I) redox cycling. *Chemical Research and Toxicology* v.18, p.1026-1037, 2005.

PITOT, H.C.; DRAGAN, Y.P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB Journal*. v.5, p.2280-6, 1991.

PITOT, H.C.; DRAGAN, Y.P; TEEGUARDEN, J.; HSIA, S.; CAMPBELL, H. Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver. *Toxicology and Pathology*. v.24, p.119-128, 1996.

- POOL-ZOBEL, B.L.; BUB, A.; MULLER, H.; WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, v.18 (9), p.1847-1850, 1997.
- RAFI, M.M. Elucidating the role of nutraceuticals in overexpressing antiapoptotic proteins in prostate cancer. *Nutrition*, v.20, p.78-82, 2004.
- SALBE, A.D.; BEJLDANES, L.F. The effects of dietary Brussels sprouts and Schizandra chinensis on the xenobiotic metabolizing enzymes of the rat small intestine. *Food Chemistry Toxicology*, v.23, p.57-65, 1985.
- SAMAHA, H.S.; KELLOFF GJ, STEELE V, RAO CV, REDDY BS. Modulation of apoptosis by sulindac, curcumin, phenylethyl-3-methylcaffeate and 6-phenylhexyl isothiocyanate: apoptotic index as a biomarker in colon cancer chemoprevention and promotion. *Cancer Res* 1997;57:1301-1305
- SAMARANAYAKE, M.D.P.; WICKRAMASINGHE, S.M.D.; ANGUNAWELA, P.; JAYASEKERA, S.; IWAI, S. and FUKUSHIMA, S. Inhibition of chemically induced liver carcinogenesis in Wistar rats by garlic (*Allium sativum*). *Phytotherapy Research*, v.14, p.564-567, 2000.
- SHIMODA, R.; NAGASHIMA, M.; SAKAMOTO, M. *et al.* Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Research*, v.54, p.3171-3172, 1994.
- SILINS, I. Regulation of p53 and susceptibility to cell death in chemically-induced preneoplastic hepatocytes. Tese de Doutorado, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institute, 2003, 50p.
- SIQUEIRA, F.; JORGE, E.C.; SANTOS, S.E.C.; AVELAR, G.A.; SOUZA Jr., M.D.; MELO, C.M.R; COUTINHO, L.L.; LOPES, C.R.; GARCIA, J.F. Hibridização de cDNA bovino em *macroarray* humano. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.33, p. 82-87, 2004.
- SMITH, T.K.; LUND, K.; JOHNSON, I.T. Inhibition of dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci and induction of apoptosis in rat colon following oral administration of the glucosinolate sinigrin. *Carcinogenesis*, v.19 (2), p.267-273, 1998.
- SMITH TK, MITHEN R, JOHNSON I.T. Effects of Brassica vegetable juice on the induction of apoptosis and aberrant crypt foci in rat colonic mucosal crypts in vivo. *Carcinogenesis* 2003;24:491-495
- SOLT, D.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, v.263, p.701-703, 1976.
- STEINKELLNER, H.; RABOT, S.; FREYWALD, C.; NOBIS, E.; SCHARF, G.; CHABICOVSKY, M.; KNASMÜLER, S.; KASSEI, F. Effects of cruciferous vegetables

and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutation Research*, v.480-481, p.285-297, 2001.

STEINMETZ, K.A.; POTTER, J.D. Vegetables, fruits and cancer prevention: a review. *Journal American Diet Association*, v.96 p.1027-1039, 1996.

STEVENS, A.; LOWE, J. *Patologia*. 2ª ed. São Paulo: Manole. 2002, p.79-103.

STEWART, Z.A.; WESTFALL, M.D.; PIETENPOL, J.A. Cell-cycle deregulation and anticancer therapy. *Trends in Pharmacological Science*, v.24, p.139-145, 2003.

STINCHCOMBE, S.; BUCHMANN, A.; BOCK, K.W.; SCHWARZ, M. Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-p-dioxin-mediated tumor promotion in rat liver. *Carcinogenesis*, v.16, p.1271-1275, 1995.

STOEWSAND, G.S. Bioactive organosulfur phytochemicals in *Brassica oleracea* vegetables: a review. *Food Chemistry Toxicology*, v.33, n.6, p.537-543, 1995.

TALALAY, P.; FAHEY, J. W. Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *Journal of Nutrition*, v.131: p. 3027S–3033S, 2001.

TAMIMI, R.M.; HANKINSON, S.E.; CAMPOS, H.; SPIEGELMAN, D.; ZHANG, S.; COLDITZ, G.A.; WILLETT, W.C.; HUNTER, D.J. Plasma carotenoids, retinol, and tocopherols and risk of breast cancer. *American Journal of Epidemiology*, v.161, p.153-160, 2005.

TANAKA, T. Chemoprevention of human cancer: biology and therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v.25, p.139-174, 1997.

TANNAPFEL, A. and WITTEKIND, C. Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. *Virchows Archives*, v.440, p.345-352, 2002.

TERRY, P.; WOLK, A.; PERSON, I. and MAGNUSSON, C. Brassica vegetables and breast cancer risk. *Journal American Medicine Association*, v.286. p.2975-2977, 2001.

THOMPSON, H.J.; HEIMENDINGER J.; HAEGELE A.; SEDLACEK S.M.; GILLETTE C.; O'NEILL C.; WOLFE P.; CONROY C.; Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage. *Carcinogenesis*, v.20, p.2261-2266, 1999.

TOLEDO, L.P.; ONG, T.P.; PINHO, A.L.; JORDÃO, A.JR.; VANNUCCHI, H.; MORENO, F.S. Inhibitory effects of lutein and lycopene on placental glutathione S-transferase-positive preneoplastic lesions and DNA strand breakage induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model of hepatocarcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, v.47, 62-69, 2003.

- TOYOKUNI, S.; TANAKA, T.; HATTORI, Y. Quantitative immunohistochemical determination of 8-hidroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Laboratory Investigation*, v.76, p.365-374, 1997.
- UHL, M.; KASSIE, F.; RABOT, S.; GRASL-KRAUPP, B.; CHAKRABORTY, A.; LAKY, B.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Effect of commun *Brassica* vegetables (Brussels sprouts and red cabbage) on the development of preneoplastic lesions induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) in liver and colon of Fischer 344 rats. *Journal of Chromatography B*, v.802, p.225-230, 2004.
- VERHAGEN, H.; POULSEN, H.E.; LOFT, S.; van POPPEL, G.; WILLEMS, M.L.; van BLADEREN, P.J. Reduction of oxidative DNA-damage in humans by Brussels sprouts. *Carcinogenesis*, v.16, p.969-970, 1995.
- VERHOEVEN, D.T.H.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHN, R.A.; van den BRANDT, P.A.; van POPPEL, G. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chemico-Biological Interactions*, v.103, p.79-129, 1997.
- VERKERK, R.; van der GAAG, M.S.; DEKKER, M.; JONGEN, W.M.F. Effects of processing conditions on glucosinolates in cruciferous vegetables. *Cancer Letters*, v.114, p.193-194, 1997.
- VERNA, L.; WHYSNER, J.; WILLIAMS, G.M. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacology and Therapy*, v.71, p.57-81, 1996.
- WEINBERG, R.A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Research*, v.49, p.3713-3721, 1989.
- WILSEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemistry Journal*, v.313, p.17-29, 1996.
- WORTELBOER, H.M.; KRUIF, C.A.; van IERSEL, A.A.; VOOHOEK, J.; BLAAUBOER, B.J.; FALKER, H.E. Effect of cooked Brussels sprouts on cytochrome P-450 profile and phase II enzymes in liver and small intestine mucosa of rats. *Food Chemical Toxicology*, v.30, p.17-27, 1992.
- YUAN, J.M.; GAGO-DOMINGUEZ, M. CASTELAO, J.E.; HANKIN, J.H.; ROSS, R.K. YU, M.C. Cruciferous vegetables in relation to renal cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, v.77, 211-216, 1998.
- YUAN, J.M.; GAO, Y.-T.; ONG, C.-N.; ROSS, R.K. YU, M.C. Prediagnostic level of serum retinol in relation to reduced risk of hepatocellular carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, v.98, p.482-490, 2006.
- ZHANG, S.M.; HUNTER, D.J.; ROSNER, B.A.; GIOVANNUCCI, E.L.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E. and WILLETT, W.C. Intake of fruits, vegetables and related

nutrients and the risk of non-Hodgkin's lymphoma among women. *Cancer Epidemiology Biomarker Previews*, v.9, p.477-485, 2000.

ZHANG, S.M.; TALALAY, P.; CHO, C.G. and POSNER, G.H. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.89, p.2399-2403, 1992.

ZHANG, Y. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutation research*, v.555, p.173-190, 2004.

ZHU, C.Y.; LOFT, S. Effect of chemopreventive compounds from *Brassica* vegetables on NAD(P)H:quinone reductase and induction of DNA strand breaks in murine hepa 1c1c7 cells. *Food and Chemical Toxicology*, v.41, p.455-462, 2003.