UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
ÁREA DE NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL

**“AUSÊNCIA DE ATIVIDADE QUIMIOPREVENTIVA DA GOIABA
VERMELHA E DA GOIABA BRANCA QUANDO ADMINISTRADAS A
RATOS WISTAR SUBMETIDOS A MODELO DE
HEPATOCARCINOGÊNESE”**

Gracielli Castro Hage

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientador:
Prof. Dr. Franco Maria Lajolo

SÃO PAULO
2005

18322

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011333

Ficha Catalográfica

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

Hage, Gracielli Castro

H141a Ausência de atividade quimiopreventiva da goiaba vermelha e da goiaba branca quando administradas a ratos Wistar submetidos a modelo de hepatocarcinogênese / Gracielli Castro Hage. -- São Paulo, 2005.
91p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Lajolo, Franco Maria

I. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos 2. Câncer : Prevenção I. T. II. Lajolo, Franco Maria Orientador.

641.1 CDD

Gracielli Castro Hage

AUSÊNCIA DE ATIVIDADE QUIMIOPREVENTIVA DA GOIABA VERMELHA E DA
GOIABA BRANCA QUANDO ADMINISTRADAS A RATOS WISTAR
SUBMETIDOS A MODELO DE HEPATOCARCINOGENÊSE

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Franco Maria Lajolo
orientador/presidente

1° examinador

2° examinador

São Paulo, ____ de _____ de _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Elias e Maria da Graça pelo incentivo, paciência e apoio às minhas decisões, nunca deixando de exigir e garantir o melhor para mim. Assim, devo a eles a honra de completar mais uma etapa tão importante na minha vida.

Ao meu irmão Cleber, pela amizade, companheirismo, carinho, incentivo e dedicação.

Ao Prof. Tit. Franco Maria Lajolo, meu orientador, pela paciência, dedicação, confiança e sugestões que proporcionaram o amadurecimento científico para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Moreno e ao Dr. Thomas Prates Ong pela grande ajuda, apoio, confiança, sugestões. Enfim, agradeço pelo acolhimento em seu laboratório e inserção no mundo científico dado com ênfase no ensino em relação à melhor maneira, tanto ética quanto profissional, de se tornar um bom pesquisador.

A Prof. Tit. Maria Lúcia Dagli, da FMVZ-USP, pela amizade, pelo carinho e preocupação, pelo aprendizado, assim como pela realização do exame histopatológico no presente estudo.

Ao Prof. Alceu Jordão Jr., da FMRP-USP, pela paciência e pela dedicação quanto à execução da determinação das concentrações hepáticas de carotenóides.

A Dr. Tânia Shiga pela grande ajuda, amizade e paciência.

Agradeço também:

Aos amigos do Laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos: Amanda, Fernanda P., Janaína, Ana Paula, Milana, Grazielli B., Graziela, Maria Aderuza, Ricardo, Maurício, João Paulo, Renato, Cláudia, Marcelo, Giselli, Fernanda, Márcia, Marcinha, Lúcia, Paola, Neuza, Ana Cris, Roberta, Claudinéia, Alexandre, Malu, Adair, Rosecler, Andréia, Adriana, Denise, Ana R., Eliana.

Aos amigos do Laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer: Aline, Bianca, Joice, Carlos Eduardo, Rogério, Renato, Mariana, Renata, Mônica, Alessandra.

Aos professores Sílvia Cozzolino, Célia Colli, Inar, Bernadete Franco, Jorge Mancini, Eduardo Purgato, Beatriz Cordenunsi, João Roberto, Maria Inês Genovese, Tullia Filisetti-Cozzi.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental: Tânia, Mônica, Edilson, Lourdes, Joana.
Aos amigos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental: Patrícia, Cintia, Giovana, Elma, Fernanda, Carioca, Helena, Malu, Simone, Janaína.

Aos funcionários do Biotério da FCF/IQ-USP: Alexandre, Elaine, Eurídice, Fátima, Flávia, Renata, Wagner, Roberto, Isael e Silvânia, pelo fornecimento e cuidado dos animais.

Às minhas eternas amigas da época de graduação, tão amadas: Susi Elaine Dal Belo, Julie Christie, Priscila Oliveira, Maria Fernanda, Daniela Zitei, Denise Rose Machado.

Ao CNPq que apoiou o presente estudo com a concessão da bolsa de mestrado.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	9
2	Revisão da Literatura.....	12
2.1	Câncer.....	12
2.2	Carcinogênese	13
2.3	Carcinogênese Química	14
2.4	Proliferação celular e Apoptose.....	17
2.5	Hepatocarcinogênese e modelo “DEN-Hepatectomia Parcial”.....	19
2.6	A Relação dieta, nutrição e câncer	22
2.7	Quimioprevenção do câncer	24
2.8	Goiaba e seus componentes potencialmente quimiopreventivos.....	26
3	OBJETIVO	32
3.1	Específico.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1 PARA A DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO DE ADMINISTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE GOIABA VERMELHA E GOIABA BRANCA	32
4.1.1	Animais	32
4.1.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1.....	33
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2 PARA A DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO 3 DE ADMINISTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE GOIABA VERMELHA E GOIABA BRANCA	33
4.2.1	Animais	33
4.2.2	Preparo dos sucos.....	34
4.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3 PARA AVALIAÇÃO DAS EVENTUAIS ATIVIDADES QUIMIOPREVENTIVAS DA GOIABA VERMELHA E GOIABA BRANCA EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A MODELO DE HEPATOCARCINOGENESE	35
4.3.1	Animais	35
4.3.2	Modelo de hepatocarcinogênese “DEN-Hepatectomia Parcial”.....	35
4.3.3	Preparo dos sucos de goiaba vermelha e goiaba branca para a administração no Protocolo Experimental 3.....	36
4.3.4	Delineamento do Protocolo Experimental 3 para a avaliar as eventuais atividades quimiopreventivas da GV e GB quando administradas a ratos Wistar submetidos a modelo de hepatocarcinogênese	36
4.4	Análise morfométrica de LPN hepáticas GST-P positivas	39
4.4.1	Marcação imunoistoquímica da GST-P	39
4.4.2	Procedimento para quantificação de LPN GST-P positivas	40
4.5	Exame Histopatológico por meio de coloração pela hematoxilina e eosina (H&E)	40
4.6	Avaliação da apoptose	41
4.7	Determinação das concentrações de licopeno no fígado dos animais submetidos ao Protocolo Experimental 3.....	42
4.8	Análise estatística.....	43

5	RESULTADOS.....	44
5.1	PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1	44
5.1.1	Evolução do peso de ratos Wistar tratados com água ou com a goiaba vermelha e goiaba branca através da gavagem, bem como o consumo de ração dos animais do Protocolo Experimental 1 para definição do protocolo de administração das amostras de goiaba vermelha e goiaba branca.....	44
5.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2	47
5.2.1	Comportamento de sedimentação dos sucos.....	47
5.2.2	Teste de aceitação dos sucos pelos animais.....	47
5.3	Protocolo Experimental 3 para avaliação das eventuais atividades quimiopreventivas da GV ou GB em ratos Wistar submetidos a modelo de hepatocarcinogênese.....	50
5.3.1	Pesos corpóreos ao início e final do tratamento, bem como pesos dos fígados por ocasião do sacrifício e consumo de ração dos animais submetidos ao Protocolo Experimental 3	50
5.3.2	Análise morfológica de LPN hepáticas GST-P positivas dos animais submetidos ao Protocolo Experimental 3.....	56
5.3.3	Exame histopatológico por meio de coloração pela hematoxilina e eosina (H&E) dos fígados dos animais submetidos ao Protocolo Experimental 3	58
5.3.4	Avaliação da apoptose hepática em animais submetidos ao Protocolo Experimental 3	59
5.3.5	Determinação das concentrações de licopeno no fígado dos animais submetidos ao Protocolo Experimental 3.....	60
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÕES	77
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Protocolo Experimental 3.	38
Figura 2.	Curva de crescimento de ratos Wistar tratados por meio de gavagem com água (grupo AG= controle), goiaba vermelha (grupo GV) ou goiaba branca (grupo GB).	46
Figura 3.	Curva do consumo de ração de ratos Wistar tratados por meio de gavagem com água (grupo AG= controle), goiaba vermelha (grupo GV) ou goiaba branca (grupo GB).	46
Figura 4.	Curva de crescimento de Ratos Wistar tratados com água (grupo AG= controle), suco de goiaba vermelha (grupo GV) e suco de goiaba branca (grupo GB).	48
Figura 5.	Curva de consumo de ração de ratos Wistar tratados com água (grupo AG= controle), suco de goiaba vermelha (grupo GV) e suco de goiaba branca (grupo GB).	49
Figura 6.	Curva de consumo de suco ou água de ratos tratados com água (grupo AG= controle), goiaba vermelha (grupo GV) e goiaba branca (grupo GB).	49
Figura 7.	Curva de crescimento de ratos Wistar tratados com água (grupo AG= controle), goiaba vermelha (grupo GV) e goiaba branca (grupo GB), fornecidos na água de beber e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese.	53
Figura 8.	Consumo de ração de ratos tratados com água (grupo AG= controle), goiaba vermelha (grupo GV) e goiaba branca (grupo GB), fornecidos na água de beber e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese.	54
Figura 9.	Consumo de suco ou água de ratos tratados com água (grupo AG =controle), goiaba vermelha (grupo GV) e goiaba branca (grupo GB), fornecidos na água de beber e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese.	55
Figura 10.	Digitalização de fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato Wistar tratado com água (grupo água, controle) durante 8 semanas consecutivas em período compreendendo as etapas de iniciação e promoção do modelo DEN-HP (Protocolo Experimental 3). Verificar a presença de foco de LPN marcada imunoistoquimicamente com anticorpo anti GST-P. Objetiva de 10X.	57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Pesos corpóreos bem como consumo de ração por ratos Wistar, 44 tratados pela gavagem, com AG, GV ou GB durante 9 dias consecutivos (Protocolo Experimental 1).
- Tabela 2. Pesos corpóreos bem como consumo de ração e suco por ratos 47 Wistar, tratados pela água de beber, com AG, GV ou GB durante 7 dias consecutivos (Protocolo Experimental 2).
- Tabela 3. Pesos corpóreos e dos fígados, bem como consumo de ração e de 51 suco de ratos Wistar normais ou tratados, pela água de beber (bebedouro), com AG, GV ou GB durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e promoção do modelo “DEN-Hepatectomia Parcial” (Protocolo Experimental 3).
- Tabela 4. Morfometria de lesões pré-neoplásicas LPN em fígado de ratos Wistar 56 submetidos ao modelo “DEN-Hepatectomia Parcial” (Protocolo Experimental 3) e tratados por meio da água de beber, com GB, GV ou água durante as etapas de iniciação e promoção.
- Tabela 5. Número de Corpúsculos Apoptóticos (CA) por mm² (no surrounding e 59 na lesão) de área do corte de fígado de ratos Wistar submetidos ao modelo “DEN-HP” (Protocolo Experimental 3) e tratados, por meio da água de beber (bebedouro), com GB, GV ou AG durante as etapas de iniciação e promoção.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Alguns componentes identificados e quantificados na goiaba vermelha 64 e na goiaba branca.
- Quadro 2. Comparação entre o Estudo Presente e outros estudos nos quais o 73 licopeno foi administrado a ratos em diferentes formas de administração.

ABREVIATURAS

ACS – American Cancer Society, Sociedade Americana de Cancer

AG – água

CA – corpúsculos apoptóticos

CCl₄ – tetracloreto de carbono

CDKs – quinases dependentes de ciclina

DEN – dietilnitrosamina

DEN-HP – dietilnitrosamina-hepatectomia parcial

EPIC – European Prospective Investigation on Cancer and Nutrition,

Investigação Prospectiva Européia em Câncer e Nutrição

FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

GB – goiaba branca

GV – goiaba vermelha

GST-P – glutathione S-transferase placentária

HCC – Carcinoma hepatocelular

HBV – vírus da hepatite B

HCV – vírus da hepatite C

H&E – hematoxilina e eosina

HP – hepatectomia parcial

HPLC – High Performance Liquid Chromatography, Cromatografia Líquida de Alta Performance

LPN – lesão pré-neoplásica

N – normal

PBS – solução salina tamponada com fosfato

P.C. – peso corpóreo

S – sacrifício

TNF – fatores de necrose tumoral

USP – Universidade de São Paulo

WHO – World Health Organization, Organização Mundial de Saúde

RESUMO

No presente estudo avaliou-se o potencial quimiopreventivo da goiaba vermelha (GV) e da goiaba branca (GB) quando administradas a ratos Wistar durante as etapas de iniciação e promoção do modelo de hepatocarcinogênese de Ito *et al.* (1988) (DEN-HP). De acordo com o Protocolo Experimental 3, os animais receberam durante 8 semanas consecutivas, continuamente durante as etapas de iniciação e promoção, água de beber (grupo AG= controle) ou suco com 10% de goiaba vermelha (grupo GV) ou goiaba branca (grupo GB). Um grupo permaneceu no mesmo local e não foi submetido ao modelo (grupo normal). Duas semanas após o início dos tratamentos, os grupos foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de Ito (Ito *et al.*, 1988) (DEN-HP), exceto pelo grupo normal. Esse modelo consistiu na aplicação intraperitoneal de uma dose do agente iniciante dietilnitrosamina (DEN, 20 mg/100 g de p.c.), seguida, 3 semanas após, de uma hepatectomia parcial (HP) a 70%. Decorridas 6 semanas após a iniciação com DEN, todos os animais foram sacrificados. De acordo com a análise morfométrica das lesões pré-neoplásicas (LPN) hepáticas positivas para a enzima glutathione S-transferase forma placentária (GST-P), não foram constatadas diferenças ($p>0,05$) entre os grupos controle, GV e GB quanto ao número bem como quanto à área média das LPN GST-P positivas e área agregada do corte ocupada por estas. Com relação ao índice de apoptose, também não foram constatadas diferenças ($p>0,05$) entre os grupos controle, GV e GB. Houve acúmulo de licopeno hepático por parte de ambos os grupos GV e GB em relação ao grupo AG constatado pela detecção e quantificação por meio da técnica por HPLC. De acordo com os resultados do estudo, quando administradas a ratos Wistar continuamente durante as etapas de iniciação e promoção do modelo de hepatocarcinogênese de Ito (DEN-HP), a GV ou

a GB não foram capazes de apresentar atividade quimiopreventiva efetiva, apesar do acúmulo de licopeno hepático nos animais desses grupos.

SUMMARY

Lack of chemopreventive activities of white guava and red guava when administered to Wistar rats submitted to hepatocarcinogenesis model.

In the present study, the chemopreventive activity of red guava (RG) and white guava (WG) was evaluated when administered to Wistar rats during the initiation and promotion phases of Ito's hepatocarcinogenesis model (DEN-HP) (Ito *et al.*, 1988). In the Experimental Protocol 3, animals received during 8 consecutive weeks, continuously during the initiation and promotion phases, drinking water (control group= W) or 10% red guava juice (group RG) or 10% white guava juice (group WG). A group was kept in the same place as the others and was not submitted to the model (normal group= N). Two weeks after the beginning of the treatments, the groups were submitted to Ito's hepatocarcinogenesis model (DEN-HP) (Ito *et al.*, 1988) except by the normal group. Initiation was obtained by administration of a single intraperitoneal dose of diethylnitrosamine (DEN; 20 mg/100 g b.w.) followed, 3 weeks after, by a partial (70%) hepatectomy (PH). Six weeks after DEN initiation, the animals were anesthetized and sacrificed by exsanguination. According to morphometrical analysis of placental form of glutathione S-transferase (GST-P) positive PNL, no differences ($p>0,05$) were observed among the W, RG, and WG groups regarding the number, average area of GST-P positive PNL, and area of the liver section occupied by these GST-P positive PNL observed. According to apoptosis index, there were also no differences ($p>0,05$) observed among the W, RG, and WG groups. Lycopene was stored in the livers of animals from both RG and WG groups compared to W, as it was detected and measured using HPLC.

According to the results of the study, RG and WG did not present chemopreventive activity when administered to Wistar rats continuously during the initiation and promotion phases of Ito's hepatocarcinogenesis model (DEN-HP) (Ito *et al.*, 1988).

1 INTRODUÇÃO

Desde 1990, mais de 18 milhões de novos casos de câncer foram diagnosticados no mundo. Para o ano de 2004, estimou-se cerca de 1.368.030 novos casos. Os Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos estimam que o gasto total devido ao câncer, no ano de 2003, foi de 189.5 bilhões de dólares (American Cancer Society-ACS, 2004).

O câncer de pulmão é o tipo de câncer mais comum no mundo, contabilizando mais de 12 milhões de novos casos anualmente; em segundo lugar, destaca-se o câncer de mama com mais de 1 milhão de casos, seguido pelo câncer de cólon e reto com 940.000 casos, câncer de estômago com 870.000 casos e câncer de fígado com 560.000 casos (World Health Organization-WHO, 2003).

O carcinoma hepatocelular (HCC) é um dos tipos de tumor maligno de maior incidência no mundo, chegando a causar o óbito de até 1.25 milhões de pessoas ao ano (Quaglia *et al.*, 2001).

A quimioprevenção do câncer é definida como o processo de inibição ou reversão do processo de carcinogênese pela administração de compostos naturais ou sintéticos. A descoberta desses compostos ocorreu paralelamente ao melhor entendimento do processo carcinogênico, em nível celular e molecular (Tanaka, 1997). Wattenberg (1995), em sua revisão, enfatiza que há um consenso de que a melhor maneira de se reduzir a incidência de câncer em uma população é por meio de sua prevenção. Conney (2003) cita a pesquisa pioneira de Wattenberg *et al.* em animais, que demonstra a atividade quimiopreventiva do câncer por parte de grande número de compostos presentes na dieta, bem como os trabalhos iniciais conduzidos por Sporn e seus colaboradores.

A elevada ingestão de frutas e hortaliças está associada com a redução da incidência de doenças, tais como as doenças coronarianas e o câncer, em que o estresse oxidativo participa de seu desenvolvimento. Uma das teorias prevalentes, atualmente, enfatiza que a elevada quantidade de compostos antioxidantes em frutas e hortaliças desempenham papel significativo na prevenção de doenças, embora, outros compostos bioativos também possam ser relevantes (Moller *et al.*, 2004). Tamimi *et al.* (2002) relatam em seu trabalho que os efeitos benéficos à saúde por parte desses alimentos são atribuídos à presença de compostos específicos tais como vitaminas, fibra alimentar, carotenóides, flavonóides, indóis e compostos fenólicos.

A goiaba, *Psidium guajava* L., é uma espécie pertencente à família Myrtaceae ou Myrtle, originária da América Central e do sul do México (Somogyi, Barrret e Hui, 1996).

Segundo o trabalho conduzido por Luximon-Ramma *et al.* (2003), o extrato aquoso da casca, polpa e semente das goiabas (*Psidium guajava* L.) rosa e branca apresentam compostos fenólicos, dentre eles as proantocianidinas e flavonóides, além de vitamina C, os quais foram relacionados à significativa capacidade antioxidante das frutas *in vitro*.

Steinmetz e Potter (1991) relatam em seu estudo que existem associações entre uma grande variedade de frutas e hortaliças e as suas influências individualmente específicas sobre diferentes tipos de câncer (por exemplo, as cenouras e as hortaliças de cor amarelo-escura parecem oferecer efeito de proteção para o pulmão).

Não existem descrições na literatura quanto ao potencial quimiopreventivo da goiaba vermelha (GV) ou goiaba branca (GB), especificamente na hepatocarcinogênese.

Modelos de hepatocarcinogênese vêm sendo considerados dentre os melhores para o estudo da gênese e desenvolvimento *in vivo* de neoplasias visto que o padrão de desenvolvimento da neoplasia maligna do fígado em ratos é semelhante ao que se observa em humanos (Farber, 1988; Bannasch *et al.*, 2003). Dentre os vários protocolos de hepatocarcinogênese existentes para ratos, o modelo de média duração “DEN-Hepatectomia Parcial” (DEN-HP) (Ito *et al.*, 1988) é considerado confiável e prático para a identificação do potencial carcinogênico e anticarcinogênico de substâncias químicas em período de tempo relativamente curto (Ito *et al.*, 2003).

Assim, pretendeu-se neste estudo avaliar as eventuais atividades quimiopreventivas da goiaba vermelha e goiaba branca quando administradas a ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese de Ito *et al.* (1988).

2 REVISÃO DA LITERATURA.

2.1 CÂNCER

Considera-se que o médico grego Hipócrates (460-370 A.C.) tenha sido responsável pela origem da palavra “câncer”. Ele usou os termos “carcinoma” e “carcinos” para descrever tumores formadores e não formadores de úlcera, respectivamente. Em grego, essas palavras se referem a caranguejo, termos provavelmente aplicados a essa doença devido às projeções do câncer serem semelhantes a dedos que se espalham, o que lembra o formato desse animal (American Cancer Society-ACS, 2004).

A descrição mais antiga de câncer em seres humanos foi encontrada no Egito em um papiro que data de 1.600 A.C. Essa escritura descreve 8 casos de tumores ou úlceras de mama que foram tratados através de cauterização (ACS, 2004). O câncer é considerado uma das doenças de maior incidência no mundo, contabilizando mais de sete milhões de mortes ao ano (Magrath e Litvak, 1993). Devido ao fato de ser uma das principais causas de morte em países desenvolvidos e em desenvolvimento, só perdendo para o infarto do miocárdio, o câncer tornou-se um tópico importante da área médica (Gruddy, 1991). A maioria dos tipos de câncer em humanos (80-90%) são atribuíveis a fatores ambientais (Benjamin *et al.*, 1990).

De acordo com o Relatório Mundial do Câncer, as taxas de incidência de câncer podem aumentar em 50% nos próximos 20 anos, chegando a 15 milhões de novos casos devido ao envelhecimento da população de países desenvolvidos e em desenvolvimento além da tendência de prevalência do modismo do fumo do cigarro e do aumento da adoção de estilo de vida insalubre (WHO, 2003). Entretanto, o

relatório também informa que a adoção de estilo de vida saudável, incluindo o consumo de frutas e hortaliças, poderia prevenir cerca de 1/3 dos casos.

O câncer pode ser considerado doença genética: células tumorais que resultam de defeitos genéticos múltiplos causados por exposição a agentes ambientais, dietéticos, e infecciosos e também por outros fatores derivados do estilo de vida (Go *et al.*, 2003).

2.2 CARCINOGENESE

Carcinogênese é um termo geral utilizado para se denotar o desenvolvimento da neoplasia (Pitot e Dragan, 1991). Esta pode ser entendida como um aumento autônomo do número de células, independente de estímulos por fatores extracelulares tais como hormônios, ao contrário da hiperplasia, que por definição consiste na proliferação de células tecido-específicas, dependente de tais fatores de estimulação (Bannasch, 1986; Bannasch e Zerban, 1990).

Existe um sistema de classificação das neoplasias, que podem ser benignas ou malignas. As primeiras se referem a neoplasias que apresentam uma proliferação celular localizada e circunscrita, exercendo pressão nos tecidos adjacentes, mas que não ultrapassam suas divisas. Em contraste, neoplasias malignas ou cânceres têm a capacidade de se multiplicar em diferentes partes do organismo (Smuckler, 1983).

Dessa forma, a definição de uma pré-neoplasia deve incluir etapas prévias do desenvolvimento de neoplasias tanto benignas quanto malignas, especialmente devido a muitas evidências apontarem que tumores benignos não representam nada mais que estágios intermediários no desenvolvimento de neoplasma maligno. Portanto, uma pré-neoplasia não é sinônima de um pré-câncer, podendo ser descrita em nível histológico como populações de células fenotipicamente alteradas e que

não apresentam natureza neoplásica óbvia, mas que têm grandes possibilidades de progredirem para neoplasias benignas ou malignas (Bannasch, 1986).

Pode-se considerar a carcinogênese como um processo induzido ativamente em organismos vivos por uma série de agentes de natureza química ou física, que podem ser agrupados em quatro categorias distintas, ou seja, aqueles agentes responsáveis pela carcinogênese biológica, física, química ou genética (Pitot e Dragan, 1991).

Tanto na carcinogênese biológica quanto genética, o agente carcinogênico consiste de macromoléculas com peso molecular relativamente elevado, o DNA ou RNA responsáveis pela transmissão de informação; em contrapartida a carcinogênese por radiação pode ser consequência das ações diretas ou indiretas de fótons de elevada energia ou partículas sobre o DNA existente. Já no caso da carcinogênese atribuível a muitas substâncias químicas de menor peso molecular, isto pode ou não envolver a ação direta do composto químico com o DNA celular, ou mesmo o seu metabolismo a uma forma ativa, que pode então reagir com o DNA, produzindo uma alteração permanente em sua estrutura (Pitot e Dragan, 1991).

2.3 CARCINOGENESE QUÍMICA

No caso da carcinogênese química, existem agentes carcinogênicos diretos ou indiretos (ou agentes pró-carcinogênicos) que devem ser convertidos em agentes carcinogênicos definitivos, bem como agentes carcinogênicos próximos, ou seja, aqueles intermediários metabólicos entre os pré-carcinogênicos, moléculas estas na verdade ainda inativas, e os agentes carcinogênicos definitivos, eletrófilos que em última instância reagem com macro e micromoléculas presentes na célula (Venitt, 1994).

A maior parte dos agentes carcinogênicos (agentes pró-carcinogênicos) são, inicialmente, metabolizados pela família de enzimas CYP (enzimas do sistema monooxigenase de fase I) em metabólitos biologicamente inativos ou, também, em metabólitos eletrofilicos quimicamente reativos. Esses, por sua vez, são capazes de se ligar, covalentemente, a sítios específicos no DNA para iniciar a resposta carcinogênica. Os metabólitos reativos podem ser submetidos a um metabolismo adicional por enzimas de fase I ou por enzimas de fase II, tais como glutathione transferase, UDP-glucuronosiltransferase, epóxido hidrolase e NAD(P)H: quinona redutase, originando produtos biologicamente inativos (Conney, 2003). Reações de fase I envolvem oxidação, redução e hidroxilação, tornando a molécula mais hidrofílica e susceptível a destoxificação. Assim, embora muitas vezes essas reações ativem o carcinogênico, em alguns casos podem também resultar em sua inibição. Já as reações de fase II resultam em conjugação de moléculas como a glutathione a metabólitos de fase I, tornando esses últimos mais polares e passíveis de excreção (Verhoeven *et al.*, 1997).

A capacidade dos agentes carcinogênicos de se ligarem aos ácidos nucleicos foi demonstrada pela primeira vez *in vivo* por Magee e Farber (1962). A partir dessa observação, reconhece-se, hoje em dia, que a maior parte deles reage quimicamente com o DNA através da transferência a esse ácido nucleico de resíduos alquila, formando deste modo produtos estáveis conhecidos como adutos (Venitt, 1994; Dipple, 1995) que, caso não forem eliminados pelo sistema de reparo, poderão originar no genoma transições, transversões e pequenas deleções (Pitot, 2001). Assim, com a ocorrência da replicação do DNA seguida de divisão celular, o dano químico é convertido em alterações herdáveis denominadas de mutações (Willians, 2001; Bertram, 2001; Martinez *et al.*, 2003).

Após o insulto causado pelo agente genotóxico, as lesões no genoma celular distribuem-se heterogeneamente, refletindo a capacidade destas substâncias de se direcionarem a seqüências específicas ou regiões do genoma (Bohr *et al.*, 1994). Assim, evidências sugerem que genes individuais como *p53*, que desempenha importante papel na integridade do genoma (Sun *et al.*, 1995) são mais sensíveis à lesão genotóxica, dependendo de suas seqüências, de sua estrutura física na cromatina e de seu estado quanto à transcrição e replicação.

Tem-se descrito que o desenvolvimento do câncer consiste em um processo longo envolvendo múltiplas etapas na transformação das células normais em malignas, requerendo para isso aproximadamente metade da vida das diferentes espécies (Farber, 1990). Entretanto, é bastante discutível o número exato de etapas que compõe o processo carcinogênico, existindo evidências que a neoplasia ocorra em três estágios básicos denominados iniciação, promoção e progressão (Pitot *et al.*, 1996).

A iniciação corresponde ao primeiro estágio do processo neoplásico, caracterizado por alterações permanentes e irreversíveis nas células-alvo, induzidas por exposição ao agente carcinogênico (Pitot e Dragan, 1991).

A promoção, por sua vez, tem sido considerada como operacionalmente reversível, de longa duração e período no qual ocorre expansão clonal das células (Sing e Gaby, 1991).

A progressão corresponde ao último estágio do desenvolvimento neoplásico. Esta fase é caracterizada pela instabilidade cariotípica e por contínua evolução das características independentes, como mudanças bioquímicas nas células malignas, aumento da proliferação celular, invasão e metástase (Pitot e Dragan, 1991).

Assim, a carcinogênese é um processo com vários passos, com múltiplos estágios e a progressão da neoplasia intraepitelial pré-maligna ao estágio clínico, sintomático, e invasivo pode levar de metade a dois terços do período de vida de muitos animais experimentais (Farber e Sarma, 1987; O'Shaughnessy *et al.*, 2002).

2.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE

O ciclo celular eucariótico é regulado por meio de vias sinalizadoras que, por sua vez, são mediadas por uma série de reguladores deste ciclo (Pines, 1994). Esse consiste em um processo pelo qual a célula se divide e é normalmente regulado por meio de determinados genes e a ativação de proteínas regulatórias (Sherr e McCormick, 2002).

As ciclinas, por exemplo, são reguladores positivos da progressão do ciclo celular, agindo na formação de um complexo com as quinases dependentes de ciclina (CDKs), ativando-as (Van den Heuvel e Harlow, 1993; Grana e Reddy, 1995). Assim, o resultado se reflete na regulação da progressão pelas fases do ciclo celular (Schafer, 1998) que compreendem as etapas G1, S, G2 e M. A fase G1 antecede a síntese de DNA, que ocorre na fase S. Já a fase G2 antecede a mitose, ou seja, a fase M, em que ocorre a divisão celular propriamente dita (Nurse, 1994, Pines, 1995).

Genes estimuladores da proliferação celular incluem os proto-oncogenes, enquanto os inibidores são os supressores de tumor (Yonish-Rouach *et al.*, 1991). Os proto-oncogenes são expressos durante o “crescimento controlado” tal como na embriogênese, no processo de regeneração após ferimento, na regeneração do fígado que tenha sofrido algum tipo de dano, no estímulo da mitose celular por fatores de crescimento (Bishop, 1991). Já as proteínas codificadas por genes

supressores de tumor inibem a proliferação celular e/ou, podem ser capazes de controlar, diretamente, a estabilidade genômica e/ou o microambiente celular (Finnberg, 2003). Os proto-oncogenes, uma vez mutados, são ativados em oncogenes e podem atuar em vias intracelulares envolvidas com o controle da proliferação celular, sem a necessidade de estímulos externos. Exemplos de proto-oncogenes são o *c-myc* e *c-Ha-ras* (Nemeth *et al.*, 2003). Mutações no gene supressor de tumor (como por exemplo, o *p53*) também podem alterar o controle do ciclo celular, diferenciação, resultando em multiplicação excessiva de células (Harris, 1992; Nemeth *et al.*, 2003).

Dessa forma, a proliferação celular desempenha um papel importante, e até mesmo crítico, nas diversas etapas da carcinogênese de diversos órgãos e tecidos, ou seja, na iniciação, promoção e progressão (Tomatis, 1993; Farber, 1995; Mori *et al.*, 1999).

Apoptose também é denominada morte celular programada, ativa ou fisiológica, consiste em um tipo de morte celular distinta morfológica, bioquímica e molecularmente da necrose que visa eliminar células em excesso ou indesejáveis, de tecidos embrionários, durante a involução de órgãos e na regressão de neoplasias. Assim, a apoptose é reconhecida como um fenômeno biológico de ampla ocorrência, e que é complementar, mas se opõe à proliferação celular, no sentido de manter a homeostasia tecidual (Bursch *et al.*, 1994; Ueda e Shah, 1994; Columbano, 1995).

As características morfológicas associadas a apoptose incluem condensação nuclear, perda de microvilosidades, dilatação citoplasmática e fragmentação nuclear (Walczak e Krammer, 2000), processos que requerem a ação de endonucleases endógenas. Os corpúsculos apoptóticos assim formados são fagocitados por células

epiteliais vicinais e mesenquimais, incluindo macrófagos. A conseqüente degradação desses corpúsculos por lisossomos inibe a liberação de substâncias que podem causar resposta inflamatória, como a associada à necrose. Apoptose é um evento freqüente relacionado à reabsorção tecidual, involução de órgãos endócrinos, remodelação de hiperplasia hepatocelular e morte celular em tumores em crescimento (Columbano *et al.*, 1985; Sarraf e Bowen, 1986).

Sugere-se que quatro tipos principais de grupos funcionais de proteínas estão envolvidos no desencadeamento e sustentação do processo apoptótico: os membros da família de receptores para fatores de necrose tumoral (TNF), caspases, proteínas adaptadoras e membros da família Bcl-2. Alguns receptores para TNF (como por exemplo, Fas e TNFR1) desencadeiam a apoptose e, portanto são referidos como receptores de morte (Walczak e Krammer, 2000). Esses receptores são ativados por meio de ligação com alguns elementos (como por exemplo, TRAIL, TNF- α , o ligante Fas) e a expressão de alguns deles (como por exemplo, Fas, KILLER/DR5) é regulada pelo gene *p53* (Benchimol, 2001; Wu *et al.*, 1997).

2.5 HEPATOCARCINOGÊNESE E MODELO “DEN-HEPATECTOMIA PARCIAL”

O câncer hepático (carcinoma hepatocelular) é um dos principais problemas de saúde pública em países orientais, onde a infecção pelo vírus da hepatite é endêmica (Benhamiche *et al.*, 1998; El-Serag e Mason, 1999; Makimoto e Higuchi, 1999; Edwards e Macdonald, 2000). Pacientes com cirrose viral possuem um alto risco de desenvolver o câncer hepático, com uma taxa de incidência anual de câncer de aproximadamente 7% (Nishiguchi *et al.*, 1995; Oka *et al.*, 1995; Imai *et al.*, 1998; Kasahara *et al.*, 1998; Ikeda *et al.*, 1999; Yaoshida *et al.*, 1999).

A infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) ou hepatite C (HCV) é conhecida como o mais importante desencadeador do câncer hepático tanto clínica (Benhamiche *et al.*, 1998; El-Serag e Mason, 1999; Makimoto e Higuchi, 1999; Edwards e Macdonald, 2000) como experimentalmente (Kim *et al.*, 1991; Moriya *et al.*, 1998; Lerat *et al.*, 2002).

Desde o momento em que Sasaki e Yoshida descreveram em 1935 o carcinoma induzido pelo pigmento amarelo da manteiga em ratos, tumores hepáticos experimentais têm se tornado um modelo favorito para investigação da carcinogênese (Popper, 1978). Assim, desde então, vários modelos de hepatocarcinogênese têm sido desenvolvidos (Farber, 1984). A dietilnitrosamina (DEN) é um potente carcinogênico genotóxico que tem sido usado como agente de iniciação em alguns protocolos alternativos de duas etapas (iniciação-promoção) para hepatocarcinogênese (Ito *et al.*, 1988; Dragan *et al.*, 1991). A DEN é capaz de inibir o processo de mitose no fígado, induzir hipometilação e promover o desenvolvimento de focos de enzimas alteradas e câncer (Goldsworthy *et al.*, 1984; Deal *et al.*, 1989; Wilson *et al.*, 1987). No fígado a DEN é metabolizada a um íon reativo de carbonium de etila pela enzima de fase I CYP2E1. Esse produto intermediário é capaz de se ligar ao DNA do hepatócito o que resulta na formação de adutos de etila, normalmente nas posições N⁷ e O⁶ na guanina (Swenberg *et al.*, 1984). Há evidências de que depois da sua biotransformação metabólica, a DEN é capaz de produzir adutos pró-mutagênicos O⁶-etil-desoxiguanosina e O⁶-etil-desoxitimidina que podem iniciar o processo de carcinogênese no fígado (Dragan *et al.*, 1994; Verna *et al.*, 1996).

O modelo "DEN-hepatectomia parcial" (DEN-HP) consiste em procedimento eficiente para a detecção de agentes hepatocarcinogênicos químicos e para a

avaliação do potencial protetor de agentes quimiopreventivos (Ito *et al.*, 1988, 1996; Moore *et al.*, 1999). O fígado de rato oferece uma vantagem que é a facilidade de detecção de focos de lesões pré-neoplásicas (LPN), amplamente aceitos como indicadores de fase inicial da carcinogênese (Bannasch, 1986; Farber e Cameron, 1980). O protocolo padrão do ensaio DEN-HP de oito semanas consiste em dois estágios: o primeiro no qual o rato é submetido a uma injeção intraperitoneal de dietilnitrosamina (DEN, 200 mg/kg de rato) para a iniciação da carcinogênese do fígado; o segundo na terceira semana após a iniciação dos animais, em que esses são submetidos à hepatectomia parcial de dois terços (Ito *et al.*, 1988). Esse procedimento de médio-prazo para fígado de rato, de 8 semanas de duração, apresenta como biomarcadores finais o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (LPN) representadas por focos de hepatócitos alterados que expressam a forma placentária da enzima glutathione S-transferase (GST-P) (Ito *et al.*, 1988). A glutathione S-transferase é uma enzima de destoxificação no fígado, que possui muitas isoformas. Em ratos adultos, a forma GST-P é mais intensamente expressa durante o estágio inicial da hepatocarcinogênese química (Iddamaldeiya *et al.*, 2003). A marcação com GST-P por meio de imunoistoquímica revela que esta enzima está presente em quantidades elevadas em focos e nódulos de hepatócitos, como também nos hepatocarcinomas produzidos através de diferentes modelos experimentais (Rushmore *et al.*, 1988).

Baseado nas características morfológicas, diferentes focos de hepatócitos são detectados em tecidos corados com hematoxilina-eosina (Bannasch e Zerban, 1990). Um marco para o estudo dos estágios iniciais da hepatocarcinogênese foi a descoberta de que ratos tratados com nitrosaminas produziram focos de lesões hepáticas os quais foram caracterizados por um armazenamento em excesso de

glicogênio nos hepatócitos (Bannasch e Müller, 1964) demonstrado através de métodos citoquímicos (Bannasch e Müller, 1964; Bannnasch, 1986). Através de muitos estudos investigativos, com o uso de microscopia de luz e eletrônica, nos quais os ratos foram tratados com *N*-nitrosomorfolina continuamente ou por curtos períodos de tempo (experimentos com interrupção), notou-se a ocorrência de uma seqüência de mudanças celulares desde hepatócitos claros e acidofílicos que armazenam glicogênio em excesso (“glicogenose”) a células de hepatomas basofílicas pobres em glicogênio, porém ricas em ribossomos livres ou ligados à membrana (Bannasch e Müller, 1964; Bannach, 1968). As células pré-neoplásicas claras e aquelas acidofílicas, que armazenam glicogênio, constituem focos que persistem depois da retirada do agente carcinogênico e podem progredir através de focos intermediários de células mistas e basofílicas a nódulos neoplásicos (adenomas) e carcinomas hepatocelulares. Essa seqüência de desenvolvimento também foi observada durante a hepatocarcinogênese induzida em ratos por outras substâncias tais como a dietilnitrosamina, dimetilazobenzeno ou tioacetamida (Bannasch *et al.*, 1980).

2.6 A RELAÇÃO DIETA, NUTRIÇÃO E CÂNCER

O comentário de que a dieta possui efeito de relevância significativa sobre a saúde provém da combinação de pesquisas epidemiológicas e experimentais. A variação da incidência de câncer entre diferentes países, e em sucessivas gerações de pessoas que migraram de uma parte do mundo para outra, é um indicativo de que o câncer é determinado predominantemente pelo ambiente, sendo a dieta a variável mais importante (Wattenberg, 1985).

Evidências sugerem que, aproximadamente, 1/3 das mortes devidas a câncer que ocorrem nos Estados Unidos a cada ano são devidas a fatores nutricionais, falta de atividade física e obesidade. Para a maior parte da população norte americana que não faz uso do tabaco, escolhas na alimentação e atividade física são os fatores modificáveis de maior importância para o risco de incidência de câncer (American Cancer Society, 2004).

De acordo com alguns estudos epidemiológicos em humanos, observou-se que o aumento no consumo de frutas e hortaliças está associado à redução do risco de incidência de câncer em vários órgãos, especialmente nos pulmões e trato gastrointestinal (Block, 1992; Steinmetz *et al.*, 1991).

Doll (1992), em sua revisão, sugeriu que o risco de câncer fatal possa ser reduzido em 35% por meio de modificações na alimentação.

Segundo a WHO (2003) dados epidemiológicos indicam que o consumo freqüente de frutas e hortaliças pode reduzir o risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer de origem epitelial, incluindo os carcinomas de faringe, laringe, pulmão, esôfago, estômago, cólon e cérvix.

Dados recentes da Investigação Prospectiva Européia em Câncer e Nutrição (EPIC) sugerem que o consumo diário de 500 gramas de frutas e hortaliças pode diminuir a incidência de alguns tipos de câncer do trato digestório em até 25% (WHO, 2003).

A fibra alimentar e microconstituintes antioxidantes de alimentos derivados de plantas são considerados agentes de papel significativo na prevenção de doenças crônico-degenerativas não-transmissíveis (Fahey *et al.*, 1999).

2.7 QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER

Quimioprevenção pode ser definida como prevenção do câncer através da ingestão de um ou de vários compostos (Wattenberg *et al.*, 1992). Esses compostos abrangem os de natureza sintética e as substâncias naturalmente encontradas na alimentação (Wattenberg *et al.*, 1992; Wattenberg, 1992).

Os agentes quimiopreventivos podem ser classificados em dois grupos principais: agentes bloqueadores ou anti-iniciadores e supressores ou anti-promotores (Wattenberg *et al.*, 1992; Wattenberg, 1992). Agentes bloqueadores impedem os agentes carcinogênicos de atingir ou interagir com sítios-alvos críticos nos tecidos. Agentes supressores agem após o dano induzido por agentes carcinogênicos. Eles impedem a evolução do processo neoplásico nas células que poderiam se tornar malignas. Alguns compostos podem apresentar ambas as características. Há dois mecanismos através dos quais os compostos bloqueadores podem agir. Assim, eles podem: impedir a ativação do agente carcinogênico, acelerar a destoxificação de agentes carcinogênicos. Há mais de vinte grupos diferentes de agentes bloqueadores. Muitos desses agentes fazem parte da alimentação, como minoria não-nutriente (Wattenberg, 1996).

Alguns agentes bloqueadores de alimentos são os indóis, isotiocianatos e ditioletonas em vegetais crucíferos, terpenos de sucos de frutas cítricas, organossulfurados de alho, galato de epigallocatequina do chá verde e inibidores de protease do feijão, e também alguns carotenóides, cumarinas, e curcuminas (Wattenberg, 1980; Wattenberg *et al.*, 1994)

A segunda principal categoria de agentes quimiopreventivos é representada pelos agentes supressores (Wattenberg, 1992; Wattenberg, 1993). Esses compostos podem prevenir a evolução do processo neoplásico nas células previamente

iniciadas. Alguns podem agir através da indução da diferenciação, enquanto que outros são capazes de promover a inibição seletiva da proliferação de células de potencial maligno, ou ainda, a sua morte por apoptose (Wattenberg, 1993; Chapkin e Lupton, 1999). Já foram identificados agentes supressores pertencentes a diferentes grupos de substâncias químicas e dentre eles estão incluídas a vitamina A e retinóides, vitamina D e seus compostos derivados, monoterpenos, antagonistas hormonais, inibidores do metabolismo de hormônios, inibidores da cascata de ácido araquidônico, polifenóis, inibidores de protease, compostos com selênio, deidroepiandrosterona, inositol, fitatos, bem como outros compostos (Wattenberg *et al.*, 1992; Wattenberg, 1992; Wattenberg, 1993).

Estudos em modelo animal executados há mais de quarenta anos revelaram que constituintes da dieta, outros que não os nutrientes, afetam preponderantemente a incidência de câncer espontâneo em animais (Silvestone *et al.*, 1952).

A descoberta de compostos quimiopreventivos em componentes de plantas da dieta e em bebidas é particularmente importante para o campo da quimioprevenção do câncer e nisto está implícito que a prevenção do câncer pode ser feita por compostos comumente consumidos, administrados em concentrações de dose que não promovam efeitos adversos significativos (Wattenberg, 1996).

Alimentos como frutas, cereais, legumes, castanhas e sementes oferecem uma ampla variedade de compostos bioativos que podem desempenhar papel significativo na redução do risco de incidência de uma série de doenças crônicas, incluindo-se o câncer (Beecher, 1999).

2.8 GOIABA E SEUS COMPONENTES POTENCIALMENTE QUIMIOPREVENTIVOS

A goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma das espécies cultivadas mais valiosas pertencentes à família Myrtaceae. Ela é nativa da América tropical e pode ser encontrada em vários países tropicais e sub-tropicais (Cobley, 1976; Samson, 1986; Morton, 1987). A goiaba é uma fruta economicamente importante na Índia, África do Sul, Flórida, Havaí, Egito, Brasil, Colômbia, Cuba, Venezuela, Nova Zelândia, Filipinas (Wilsom, 1980; Yadava, 1996) Vietnam (Le *et al.*, 1998), e Tailândia (Tate, 2000).

O Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de goiaba (*Psidium guajava* L.). A maior parte da produção é absorvida pela indústria, porém no Estado de São Paulo, principal produtor nacional, houve um incremento de 17% na produção de goiabas para mesa no período de 2000-2001 (Instituto de Economia Agrícola, 2002).

As goiabas podem ser processadas como produtos enlatados ou através da sua conversão a suco ou purê, ou também usadas para a produção de geléia ou massa de goiaba (Shamsudin *et al.*, 2005).

A cor da casca do fruto maduro é amarela, e a cor da polpa pode ser branca, rosa, amarela, salmon, ou carmin, dependendo da variedade. A polpa contém muitos escleróides (estonas) (Chan, 1993). As goiabas normalmente são colhidas quando a polpa ainda está firme e a coloração da casca começa a mudar de verde-escuro para verde-claro ou começa a amarelecer (Manica *et al.*, 2000).

Devido à colheita de goiaba poder ser feita durante o ano todo, ao seu preço ser acessível, a poder se manter conservada quando submetida à manipulação e ao

transporte e devida à boa aceitação pelo mercado consumidor ela pode ser considerada uma fruta tropical popular (Thaipong e Boonprakob, 2005).

Há na literatura estudos feitos sobre a avaliação da goiaba como fonte de compostos antioxidantes naturais e a atividade antioxidante *in vitro* dos compostos bioativos associados (Jimménez-Escrig *et al.*, 2001; Luximon-Ramma *et al.* 2003; Guo *et al.*, 2003).

Numa revisão realizada por Diplock *et al.* (1998), com base em estudos epidemiológicos sobre compostos antioxidantes e doenças, sugeriu-se que o consumo diário de 150 mg de vitamina C associado a outras vitaminas (vitamina E, β -caroteno) está relacionado à diminuição da incidência de câncer e doenças cardiovasculares (Diplock *et al.*, 1998). Assim, 105 g de goiaba branca em sua forma integral, segundo Luximon-Ramma *et al.* (2003) possui aproximadamente essa mesma quantidade de vitamina C, além de outras vitaminas associadas (vitamina E, β -caroteno). Isso sugere que a goiaba poderia ser usada em uma dieta balanceada, podendo oferecer, assim, proteção para o organismo contra vários tipos de estresse oxidativo, constituindo uma opção mais efetiva e econômica em comparação à suplementação com compostos bioativos isolados, tais como a vitamina C ou alfa-tocoferol (Diplock *et al.*, 1998).

O grupo de Barata-Soares (2004) realizou a quantificação da vitamina C da polpa da goiaba branca e vermelha e encontraram os respectivos valores de 194 mg e 189 mg por 100 gramas de polpa de fruta (Quadro 1).

Gorintein *et al.* (1999) quantificaram a quantidade total de polifenóis, ácido gálico e fibras solúveis de algumas frutas tropicais de consumo popular. Assim, a goiaba, manga, e lichia apresentaram as maiores quantidades de polifenóis, ácido gálico e fibras solúveis.

Miean e Mohamed (2001) quantificaram a concentração de flavonóides (mirecetina, quercetina, campeferol, luteolina e apigenina) do extrato aquoso de 62 tipos de plantas tropicais comestíveis provenientes da Malásia, incluindo a goiaba. Essa apresentou 1.128,5 mg/kg de flavonóides, sendo a apigenina e mirecetina as mais abundantes.

Em estudos prévios sobre os carotenóides da goiaba, a fração com licopeno (Nakasone *et al.*, 1976; Gonzales-Abreu *et al.*, 1985), a quantidade total de β -caroteno (Fonseca *et al.*, 1969) ou ambos (Wilberg e Rodriguez-Amaya, 1995) foram determinados. Gross (1987) encontrou luteína como o único carotenóide na casca da goiaba branca. Padula e Rodriguez-Amaya (1986) identificaram 7 tipos de carotenóides em goiabas do cultivar IAC-4 do Brasil. O licopeno foi considerado como o composto presente em maior quantidade. Mercadante e colaboradores (1999) realizaram a identificação de 16 tipos diferentes de carotenóides na polpa de goiabas vermelhas (*Psidium guajava* L.) brasileiras. Por sua vez, Setiawan e colaboradores (2001) realizaram a quantificação de criptoxantina, licopeno e β -caroteno na polpa e semente de goiaba (*Psidium guajava* L.), sendo o licopeno o composto encontrado em maior quantidade.

Dentre os pigmentos naturais, os carotenóides se destacam por sua ampla distribuição em plantas, diversidade e funções variadas. A configuração particular dos carotenóides, caracterizada por uma série de ligações duplas conjugadas, é responsável por suas propriedades e funções.

Carotenóides de hidrocarbonetos (β -caroteno, licopeno) são conhecidos como carotenos. Os derivados oxigenados são chamados de xantofilas. As funções oxigenadas mais encontradas são: hidroxila (como na β -criptoxantina), oxo (como na equinenona), epoxi (como violaxantina) e aldeído (como na β -citraurina).

Carotenóides podem ser acíclicos (ζ -caroteno, licopeno), monocíclicos (γ -caroteno), ou bicíclicos (α - e β -caroteno) (Macrae *et al.*, 1993).

O licopeno é um carotenóide encontrado principalmente em tomates e produtos derivados do tomate (aproximadamente 80% do licopeno de alimentos nos Estados Unidos) (Nguyen e Schwartz, 1999). Outras fontes, secundárias, incluem goiabas, damascos, toranjas, melancias, e mamões. As concentrações de licopeno podem variar de acordo com as variedades e fases de maturação do fruto (Nguyen e Schwartz, 1999; Clinton, 1998). A biodisponibilidade do licopeno pode ser aumentada através do cozimento dos alimentos que são fontes deste composto, principalmente na presença de óleos ou gorduras (Nguyen e Schwartz, 1999; Clinton, 1998; Weisburger, 1998). Alguns estudos epidemiológicos sugerem que a elevada ingestão de hortaliças e frutas ricas em carotenóides possa prevenir contra vários tipos de câncer, tais como o câncer de próstata (Nguyen e Schwartz, 1999; Clinton, 1998; Giovannucci, 1999), de cérvix (Nguyen e Schwartz, 1999; Weisburger, 1998), de faringe e esôfago (Clinton, 1998; Krinsky, 1998; La Vecchia, 1998), de estômago (Nguyen e Schwartz, 1999; Clinton, 1998; Krinsky, 1998; La Vecchia, 1998), de bexiga (Clinton, 1998), de cólon e reto (Nguyen e Schwartz, 1999; Clinton, 1998; Weisburger, 1998; Krinsky, 1998; La Vecchia, 1998).

O licopeno, após ingerido, propicia o aumento de sua concentração no organismo. Por meio de sua ação atioxidante torna-se capaz de “aprisionar” espécies reativas de oxigênio, de aumentar o potencial anti-oxidante ou de reduzir o dano oxidativo a lipídios (lipoproteínas, lipídios de membrana), proteínas (enzimas importantes) e DNA (material genético), diminuindo assim o estresse oxidativo. Essa diminuição do estresse oxidativo pode resultar na redução do risco de incidência de câncer e doenças cardiovasculares. Alternativamente, o aumento da

concentração de licopeno no organismo pode influenciar funções determinadas pelos genes, melhorar a comunicação por meio das junções intercelulares, modular a resposta hormonal e imune, ou modular o metabolismo, diminuindo assim, o risco de incidência de doenças crônicas. Todos esses mecanismos mencionados podem interagir e atuar simultaneamente para promover benefícios à saúde (Agarwal *et al.*, 2000).

Muitas moléculas que possuem uma estrutura polifenólica (como, vários grupos hidroxila em anéis aromáticos) foram identificadas em plantas superiores e muitas delas podem ser encontradas em frutas e hortaliças. Essas moléculas são metabólitos secundários de plantas e estão envolvidas no mecanismo de defesa de plantas contra radiação uv ou agressão por agentes patogênicos. Esses compostos podem ser classificados em diferentes grupos em função do número de anéis fenólicos que eles possuem e dos elementos estruturais que ligam um anel ao outro. Portanto, distinções podem ser feitas entre os ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, e lignanas. Assim, eles podem ser divididos em 6 subclasses, de acordo com o tipo de heterociclo envolvido: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas, e flavanóis (catequinas e proantocianidinas) (Manach *et al.*, 2004).

Alguns estudos epidemiológicos demonstram uma relação inversa entre o consumo de flavonóides e o risco de incidência de vários tipos de câncer. Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os flavonóides podem intervir em várias fases do processo carcinogênico (Hollman *et al.*, 1996). Há evidências de que esses compostos bioativos apresentam atividade antioxidante assim como outras propriedades de agentes anticarcinogênicos (Rice-Evans e Miller, 1996; Tham *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001).

Os flavonóides podem atuar diretamente como “scavenger” de algumas espécies radicalares. Podem impedir a peroxidação lipídica, através da reciclagem de outros compostos anti-oxidantes, tais como o alfa-tocoferol, através da doação de um átomo de hidrogênio para a molécula de tocoferol. Além disso, alguns flavonóides são capazes de quelar íons de metais pró-oxidantes, tais como o cobre, prevenindo a formação de radicais livres enquanto, ao mesmo tempo, mantêm a sua capacidade própria de “scavenger” de radicais livres (McAnlis *et al.*, 1999).

Os flavonóides podem agir de várias maneiras além de serem antioxidantes capazes de intervir no processo de carcinogênese, também são capazes de proteger o DNA contra o dano oxidativo, por meio da desativação de agentes carcinogênicos, ou inibição da expressão de genes que foram submetidos a mutações, ou inibição da atividade de enzimas capazes de promover a carcinogênese, ou por meio da promoção de destoxificação de xenobióticos (Yang *et al.*, 2001; Hasler, 1998).

Não existem descrições na literatura quanto ao potencial quimiopreventivo da GV e GB, especificamente na hepatocarcinogênese. Assim, pretendeu-se nesse estudo avaliar as eventuais atividades quimiopreventivas da GV e GB quando administradas a ratos Wistar submetidos ao modelo DEN-HP.

3 OBJETIVO

Avaliar as eventuais atividades quimiopreventivas da GV e GB na hepatocarcinogênese.

3.1 ESPECÍFICO

Determinação das concentrações hepáticas de licopeno dos animais

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1 PARA A DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO DE ADMINISTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE GOIABA VERMELHA E GOIABA BRANCA

4.1.1 Animais

Foram utilizados neste estudo ratos machos albinos da linhagem Wistar, com pesos iniciais compreendidos entre 235 e 240 g e obtidos da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Esses permaneceram em sala desse mesmo biotério, apropriada para estudos de carcinogênese, nas seguintes condições: temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo de iluminação claro-escuro de 12 horas. (claro a partir das 6 horas.). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (4 ratos/gaiola) com tampas de aço inoxidável e contendo maravalha previamente esterilizada, que foi trocada rotineiramente em dias alternados. Esses receberam *ad libitum* durante todo o experimento, água destilada e ração comercial peletizada comum para roedores de laboratório (Purina Nutrimentos Ltda., Brasil). Os seus pesos corpóreos e consumo de ração e consumo de água de beber foram avaliados diariamente.

4.1.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1

Nesse estudo utilizou-se a técnica de gavagem (entubação gástrica), para tratar os animais com: água (grupo controle), goiaba vermelha (GV) ou goiaba branca (GB) (suspensão de frutas liofilizadas a -20°C e trituradas em moinho), durante 9 dias. As frutas utilizadas durante o estudo foram adquiridas no Supermercado Padrão, localizado nas imediações da Universidade de São Paulo. A quantidade administrada foi de 3 mL de suspensão de goiaba vermelha ou goiaba branca por 100 g de peso corpóreo (P.C.), na concentração de 1 g de fruta liofilizada para 6 mL água destilada. Foram elaboradas, a partir do registro diário, no período de 9 dias, as curvas de crescimento dos animais (peso em g/dias) e de consumo de ração (peso em g/ 100 g de peso corpóreo do animal).

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2 PARA A DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO DE ADMINISTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE GOIABA VERMELHA E GOIABA BRANCA

4.2.1 Animais

Foram utilizados neste estudo ratos machos albinos da linhagem Wistar, com pesos iniciais compreendidos entre 155 e 175 g e obtidos da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Esses permaneceram em sala desse mesmo biotério, apropriada para estudos de carcinogênese, nas seguintes condições: temperatura de 22°C $\pm$ 2°C e ciclo de iluminação claro-escuro de 12 horas. (claro a partir das 6 horas.). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (4 ratos/gaiola) com tampas de aço inoxidável e contendo maravalha previamente esterilizada, que foi trocada

rotineiramente em dias alternados. Esses receberam *ad libitum* durante todos os experimentos, água destilada e ração comercial peletizada comum para roedores de laboratório (Purina Nutrimentos Ltda., Brasil). Os seus pesos corpóreos e consumo de ração e consumo de água de beber ou suco foram avaliados diariamente.

4.2.2 Preparo dos sucos

Os sucos foram preparados a partir das frutas in natura, de acordo com Kassie *et al.* (2003). Depois de lavadas em água corrente, retirada a parte da fruta com casca e polpa e pesada, os sucos foram preparados, com água destilada em liquidificador doméstico (Walita), com um filtro acoplado. As concentrações finais dos sucos foram de 5%, 10% e 15%.

4.2.2.1 Avaliação do comportamento de sedimentação dos sucos

Foram feitos os sucos de goiaba vermelha e goiaba branca, em diferentes concentrações (5%, 10% e 15%) (Kassie, *et al.*, 2003). Observou-se, no Biotério da FCF/IQ-USP, de 30 em 30 minutos, durante 12 horas seguidas, o comportamento de sedimentação dos sucos em bebedouros próprios para ratos.

4.2.2.2 Avaliação da aceitação dos sucos pelos animais

Foram utilizados seis animais, os quais foram distribuídos de forma aleatória em três grupos: água, suco de goiaba vermelha a 10% e suco de goiaba branca a 10%, durante 7 dias consecutivos. Foram elaboradas, a partir do registro diário, as curvas de crescimento dos animais (peso em g/dias), de consumo de ração (peso em g/ 100 g de peso corpóreo do animal) e de volume consumido de suco ou água (volume em mL/100 g de peso corpóreo do animal).

4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3 PARA AVALIAÇÃO DAS EVENTUAIS ATIVIDADES QUIMIOPREVENTIVAS DA GV E GB EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A MODELO DE HEPATOCARCINOGENESE

4.3.1 Animais

Foram utilizados neste estudo ratos machos albinos da linhagem Wistar, com pesos iniciais compreendidos entre 95 e 105 g e obtidos da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Esses permaneceram em sala desse mesmo biotério, apropriada para estudos de carcinogênese, nas seguintes condições: temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo de iluminação claro-escuro de 12 horas. (claro a partir das 6 horas.). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (4 ratos/gaiola) com tampas de aço inoxidável e contendo maravalha previamente esterilizada, que foi trocada rotineiramente em dias alternados. Esses receberam *ad libitum* durante todos os experimentos, água destilada e ração comercial peletizada comum para roedores de laboratório (Purina Nutrimentos Ltda., Brasil). Os seus pesos corpóreos e consumo de ração e consumo de água de beber ou suco foram avaliados diariamente.

4.3.2 Modelo de hepatocarcinogênese “DEN-Hepatectomia Parcial”

Neste presente estudo utilizou-se para induzir a hepatocarcinogênese nos animais o modelo “DEN-hepatectomia parcial” (DEN-PH) descrito por Ito *et al.* (1988).

A iniciação dos animais ocorreu pela administração intraperitoneal de uma dose única, necrogênica do agente iniciante dietilnitrosamina (DEN; Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, EUA; 200mg/Kg de peso corpóreo [p.c.]) dissolvido em NaCl 0,9%. Ao final de três semanas após a iniciação, os animais foram submetidos a um

potente estímulo mitogênico, representado por uma hepatectomia parcial a 70%, realizada de acordo com Higgins e Anderson (1931). Na oitava semana todos os animais foram sacrificados por exsanguinação após anestesia com éter.

4.3.3 Preparo dos sucos de goiaba vermelha e goiaba branca para a administração no Protocolo Experimental 3

Os sucos foram preparados diariamente a partir das frutas in natura. Depois de lavadas em água corrente, retirada a parte da fruta com casca e polpa e pesada, os sucos foram preparados em liquidificador doméstico (Walita), com um filtro acoplado. A diluição foi feita em água destilada na proporção de 2:20 (10%). Os sucos foram colocados diariamente no início do período escuro dos animais, devido ao conhecimento de que estes consomem a maior parte da sua alimentação à noite (Classen, 1994), além de minimizar a perda de compostos degradáveis à luz, tais como vitaminas, dos sucos das frutas.

4.3.4 Delineamento do Protocolo Experimental 3 para a avaliar as eventuais atividades quimiopreventivas da GV e GB quando administradas a ratos Wistar submetidos a modelo de hepatocarcinogênese

Para a avaliação das eventuais atividades quimiopreventivas da GV e GB quando administradas a ratos Wistar na água de beber continuamente durante as etapas de iniciação e promoção do modelo DEN-HP, realizou-se o Protocolo Experimental 3.

Deu-se início ao Protocolo Experimental 3 (Figura 1) após um período de 7 dias de aclimação dos ratos. Em todos eles, 53 animais foram distribuídos de forma aleatória nos seguintes grupos experimentais:

1. Grupo normal (N): animais não submetidos a qualquer tratamento e mantidos nas mesmas condições ambientais dos animais dos demais grupos;
2. Grupo controle (AG): os animais submetidos ao modelo “DEN-hepatectomia parcial” e tratados com água destilada;
3. Grupo Goiaba Vermelha (GV): animais submetidos ao modelo “DEN-hepatectomia parcial” e tratados diariamente, com o suco a 10% de goiaba vermelha em água destilada;
4. Grupo Goiaba Branca (GB): animais submetidos ao modelo “DEN-hepatectomia parcial” e tratados diariamente, com o suco a 10% de goiaba branca em água destilada;

DEN – DIETILNITROSAMINA (20 mg/100 g p.c.)

HP – HEPATECTOMIA PARCIAL A 70%

S - SACRIFÍCIO

Figura 1: Protocolo Experimental 3

Os tratamentos com as frutas foram iniciados 2 semanas antes da aplicação da DEN e tiveram duração total de 8 semanas consecutivas.

4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE LPN HEPÁTICAS GST-P POSITIVAS

A análise morfométrica de LPN (focos) foi realizada em cortes histológicos hepáticos submetidos à reação imunoistoquímica para a enzima GST-P.

4.4.1 Marcação imunoistoquímica da 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 anticorpo secundário biotinilado anti-imunoglobulina de coelho (Vector Laboratories, EUA). Esse último consiste em anticorpo anti-IgG conjugado à biotina.

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

Os cortes histológicos dos materiais fixados em metacarn foram desparafinizados em xilol em seqüência de xilol/álcool (1:1), etanol absoluto, a 95% e a 70% e, finalmente, água destilada.

A peroxidase endógena foi bloqueada incubando-se as lâminas por 30 min. em metanol (LabSynth, Brasil) contendo 25% de peróxido de hidrogênio a 30 volumes (LabSynth, Brasil). 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 e azida sódica a 5% (LabSynth, Brasil) em água destilada e PBS.

Em seguida, os cortes foram incubados por 30 min. 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 min.

Posteriormente, foi aplicada sobre os cortes uma solução substrato de peroxidase preparada imediatamente antes da utilização. Essa solução consistiu na mistura de peróxido de hidrogênio a 0,02% (Merck, Brasil) com diaminobenzidina (Sigma, EUA) a 0,1% em PBS. Os cortes foram lavados em PBS por 5 min., contracorados pela hematoxilina e eosina, desidratados, diafanizados e montados com resina sintética.

4.4.2 Procedimento para quantificação de LPN GST-P positivas

Para se quantificar o número, área média e agregada das LPN GST-P positivas foi utilizado o sistema de análise de imagem computadorizado do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Foram consideradas apenas as LPN GST-P positivas as lesões cujo tamanho mínimo do diâmetro era $\geq 150 \mu\text{m}$ (Rizzi *et al.*, 1997; Wood *et al.*, 1999; Silveira *et al.*, 2001; Barbisan *et al.*, 2003). O sistema de análise Pro Plus é composto por um microscópio (Olympus; Japão) ao qual se encontra acoplada uma câmera de vídeo (Sony, Japão) que se conecta a um microcomputador Pentium 166, equipado com o programa Image (Media Cybernetics).

4.5 EXAME HISTOPATOLÓGICO POR MEIO DE COLORAÇÃO PELA HEMATOXILINA E EOSINA (H&E)

Cortes histológicos de fígado fixados em metacarn foram corados com hematoxilina de Harris e eosina (H&E), basicamente como descrito por Junqueira e Junqueira (1983).

A análise foi realizada pela Professora Titular Maria Lúcia Zaidan Dagli, no Laboratório de Oncologia Experimental, do Departamento de Patologia pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (USP). Os critérios morfológicos utilizados para a classificação das LPN hepáticas (focos/nódulos) foram previamente descritos por Bannasch e Zerban (1990). Assim, os focos/nódulos de células claras apresentam volume aumentado e citoplasma claro e rarefeito, que se cora com pouca intensidade pela eosina e no qual há acúmulo de glicogênio. Já os focos/nódulos de células acidofílicas apresentam volume aumentado e citoplasma acidofílico, que se cora mais intensamente pela eosina, no qual também ocorre acúmulo de glicogênio. Os focos/nódulos de células vacuolizadas apresentam muitas gotas de lipídeos no citoplasma e, eventualmente, no interior do núcleo. Os focos de células anofílicas apresentam volume aumentado, citoplasma homogêneo, acidofílico e granular, em que há pouco ou nenhum acúmulo de glicogênio. Focos/nódulos de células basofílicas são pobres ou livres de glicogênio e lipídeos, e apresentam citoplasma com basofilia difusa devido ao elevado número de ribossomos.

Além disso, por ocasião do exame histopatológico do fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais, avaliou-se a presença de células ovas, caracterizadas por apresentarem citoplasma exíguo e levemente basofílico, bem como núcleo alongado com um único nucléolo (Bannasch e Zerban, 1990).

4.6 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE

Para a avaliação da apoptose em cortes histológicos de fígado de rato empregou-se método de microscopia de fluorescência descrito por Stinchcombe *et al.* (1995). Este se baseia na observação de que corpúsculos apoptóticos (CA)

apresentam intensa fluorescência da eosina em cortes histológicos de fígado corados com H&E e submetidos à luz no comprimento de onda entre 450 e 490 nm. Assim, utilizou-se microscópio de epifluorescência (Nikon, Japão) (Laboratório de Imunologia Clínica, FCF-USP) para quantificar o número de CA tanto nas áreas de tecido sem alterações morfológicas ao redor das LPN como nas próprias. A área total dos cortes histológicos foi analisada 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 o N° de CA/mm² de área de LPN ou área de tecido sem alterações morfológicas ao redor das LPN.

4.7 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE LICOPENO NO FÍGADO DOS ANIMAIS

A determinação das concentrações hepáticas de licopeno foi realizada em amostras de fígado previamente armazenadas a -80°C, pelo Professor Dr. Alceu Jordão Jr. no Laboratório de Nutrição da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), utilizando-se o método descrito por Arnaud *et al.* (1991). Assim, 500 mg de tecido hepático foram homogeneizados em 2 mL de etanol absoluto. Em seguida, acrescentou-se 2 mL de n-hexano à solução que foi submetida à agitação por 2 minutos. Retirou-se 0,5 mL do sobrenadante, que foi seco cuidadosamente em nitrogênio e depois ressuspensa em 0,5 mL de fase móvel. A solução foi filtrada e uma alíquota de 100 µL do filtrado resultante foi injetado no HPLC (Coluna Tipo ODS-C18); com gradiente linear de acetonitrila/diclorometano/metanol (70/20/10) (fluxo de

1 mL/min.). A detecção do licopeno foi feita por UV/Vis, com coeficiente de absorção em 450 nm e quantificado contra um padrão interno de licopeno.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização da análise estatística utilizou-se o programa SigmaStat (Jandel Scientific, EUA). Como a distribuição dos dados não se apresentou normal, sem homogeneidade de variância, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, análise de variância não-paramétrica, seguido do teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Em todos os casos, o nível de confiança utilizado foi de 95%. Além disso, foi usado o teste Two-Way ANOVA, do programa Prism (GraphPad Software Inc., EUA) para a análise dos dois parâmetros de tempo e tratamento (Protocolo Experimental 3) e a relação entre os diferentes grupos.

5 RESULTADOS

5.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1

5.1.1 Evolução do peso de ratos Wistar tratados com água ou com as frutas através da gavagem, bem como o consumo de ração dos animais do PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1 para definição do protocolo de administração das amostras de goiaba vermelha e goiaba branca

A Tabela 1 apresenta os pesos corpóreos iniciais e finais e o consumo de ração por ratos Wistar tratados, pela gavagem, com água (grupo AG= controle), goiaba vermelha (grupo GV) ou goiaba branca (grupo GB), durante 9 dias consecutivos (Protocolo Experimental 1).

Tabela 1. Pesos corpóreos bem como consumo de ração por ratos Wistar, tratados pela gavagem, com AG, GV ou GB durante 9 dias consecutivos (Protocolo Experimental 1).

grupos	n	peso corpóreo inicial* (g)	peso corpóreo final* (g)	consumo médio de ração* (g/100g de peso corpóreo/dia)
AG	8	238,6± 16,7	278,7± 20,6	9,0± 0,7
GV	8	235,0± 13,6	253,8± 25,9	7,2± 1,2
GB	6	235,9± 24,5	269,3± 27,3	8,1± 1,1

AG=água (controle); GV = goiaba vermelha; GB = goiaba branca.

n = número de animais; *média ± desvio-padrão da média.

É possível, de acordo com a Tabela 1, se verificar que os pesos iniciais dos diferentes grupos foram bastante semelhantes, o que indica que a distribuição dos animais foi realizada de forma adequada e aleatória.

O peso corpóreo final, assim como o consumo médio de ração, dos animais que receberam GV e a GB tendeu a ser menor quando comparados com animais do grupo que receberam AG (AG= grupo controle).

A figura (2) apresenta o crescimento dos animais deste estudo.

O crescimento dos grupos que foram tratados com goiaba vermelha (GV) e goiaba branca (GB) se manteve abaixo do crescimento do grupo água (AG=controle).

Pode-se também observar o consumo de ração destes grupos na figura (3).

O consumo de ração dos grupos tratados com as frutas tendeu a ser menor que o do grupo controle.

Assim, pode-se concluir que a gavagem não é o melhor método para a administração das frutas, pois os animais que receberam goiaba vermelha (GV) e goiaba branca (GB) sofreram uma queda no crescimento em relação aos animais do grupo água (AG= grupo controle) e ingeriram menor quantidade de ração.

Figura 2: Curva de crescimento de ratos Wistar tratados por meio de gavagem com água (grupo AG= controle), goiaba vermelha (grupo GV) ou goiaba branca (grupo GB).

Figura 3: Curva do consumo de ração de ratos Wistar tratados por meio de gavagem com água (grupo AG= controle), goiaba vermelha (grupo GV) ou goiaba branca (grupo GB).

5.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2

5.2.1 Comportamento de sedimentação dos sucos

Nos sucos das frutas de concentração de 10% pôde-se observar melhor comportamento de sedimentação, ao longo das 24 horas, nos bebedouros dos animais.

5.2.2 Teste de aceitação dos sucos pelos animais

A Tabela 2 apresenta os pesos corpóreos iniciais e finais e o consumo de ração e suco por ratos Wistar tratados, pela água de beber, com água (grupo AG=controle), goiaba vermelha (grupo GV) ou goiaba branca (grupo GB), durante 7 dias consecutivos (Protocolo Experimental 2).

Tabela 2. Pesos corpóreos bem como consumo de ração e suco por ratos Wistar, tratados pela água de beber, com AG, GV ou GB durante 7 dias consecutivos (**Protocolo Experimental 2**).

grupos	n	peso corpóreo inicial* (g)	peso corpóreo final* (g)	consumo médio de ração* (g/100g de peso corpóreo/dia)	consumo de suco* (mL/100g de peso corpóreo/dia)
AG	6	170,5±1	218,3±1	9,9±0,9	16,8±1,8
GV	6	174,5±1	204±1	10,1±1,5	16,6±8,7
GB	6	154,5±1	210,5±1	9,4±1,3	13,6±5,0

AG=água (controle); GV = goiaba vermelha; GB = goiaba branca.

n = número de animais; *média ± desvio-padrão da média.

É possível, de acordo com a Tabela 2, se verificar que os pesos iniciais dos diferentes grupos tenderam a ser semelhantes, o que indica que a distribuição dos animais foi realizada de forma adequada e aleatória.

Os parâmetros peso corpóreo final, assim como o consumo médio de ração e suco demonstra a tendência de comportamento semelhante entre os grupos GV, GB e AG.

A curva de crescimento está representada na figura (4).

O crescimento dos grupos GV e GB foi semelhante ao grupo AG (controle), o que torna desnecessária a introdução de um grupo “pair feeding”.

A seguir a curva de consumo de ração (Figura 5) e de suco (Figura 6).

Diante desses gráficos pode-se concluir que houve boa aceitação do suco pelos animais. Não houve diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) tanto entre o consumo de AG, GV e GB, quanto de ração entre estes grupos.

Figura 4: Curva de crescimento de Ratos Wistar tratados com água (grupo AG= controle), suco de goiaba vermelha (grupo GV) e suco de goiaba branca (grupo GB).

Figura 5: Curva de consumo de ração de ratos Wistar tratados com água (grupo AG= controle), suco de goiaba vermelha (grupo GV) e suco de goiaba branca (grupo GB).

Figura 6: Curva de consumo de suco ou água de ratos tratados com água (grupo AG= controle), goiaba vermelha (grupo GV) e goiaba branca (grupo GB).

5.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3 PARA AVALIAÇÃO DAS EVENTUAIS ATIVIDADES QUIMIOPREVENTIVAS DA GV OU GB EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A MODELO DE HEPATOCARCINOGENÊSE

5.3.1 Pesos corpóreos ao início e final do tratamento, bem como pesos dos fígados por ocasião do sacrifício e consumo de ração dos animais submetidos ao Protocolo Experimental 3

A Tabela 3 apresenta os pesos corpóreos inicial e final, peso do fígado, peso relativo do fígado, por ocasião do sacrifício e o consumo de ração e de água ou de suco de ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese “DEN-Hepatectomia parcial” (Protocolo Experimental 3) e tratados, por meio da água de beber, por oito semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e promoção do modelo, com água ou sucos, divididos em 4 grupos assim definidos: normal (grupo N), água (grupo AG= controle), goiaba branca (grupo GB), goiaba vermelha (GV).

Tabela 3. Pesos corpóreos e dos fígados, bem como consumo de ração e de suco de ratos Wistar normais ou tratados, pela água de beber (bebedouro), com AG, GV ou GB durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e promoção do modelo “DEN-Hepatectomia Parcial” (**Protocolo Experimental 3**).

Grupo	n	Peso corpóreo inicial* (g)	Peso corpóreo final* (g)	Peso do fígado* (g)	Peso relativo do fígado/100g de peso de rato* (g)	Consumo médio de ração* (g/100g de peso corpóreo/dia)	Consumo de suco (mL/100g de peso corpóreo/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
AG	15	101,5 ± 5,7	345 ± 24,4	8,0 ± 1,0	2,3 ± 0,2	8,8 ± 2,5	16,0 ± 4,2
GV	14	100,8 ± 5,2	356,6 ± 23,9	8,2 ± 0,6	2,3 ± 0,1	8,5 ± 2,5	15,7 ± 3,5
GB	15	99,13 ± 7,7	328,8 ± 27,6	7,1 ± 0,8	2,2 ± 0,2	8,6 ± 2,2	17,0 ± 4,2

N = normal; AG = água; GV = goiaba vermelha; GB = goiaba branca.

n = número de animais; * média ± desvio-padrão da média.

Dessa forma, é possível se verificar que os pesos iniciais dos diferentes grupos foram bastante semelhantes, o que indica que a distribuição dos animais foi realizada de forma adequada e aleatória.

A partir do peso inicial e final dos animais, do peso total e relativo do fígado, do consumo de ração (g/100g de P.C.) e da água de beber (mL/100g de P.C.) de acordo com a tabela acima (Tabela 3), pode-se verificar que não houve diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos. Dessa forma, esses dados indicam que os sucos utilizados (na diluição 1:10, da frutas na água de beber, durante 8 semanas consecutivas) GV e GB não apresentaram toxicidade aparente.

O desenvolvimento dos animais pode ser considerado satisfatório, como refletido na figura (7).

Houve queda no crescimento apresentada na figura (7) no 16º dia, logo após a iniciação com a DEN; e também houve outra queda de peso, referente ao dia seguinte da hepatectomia, 36º dia, em relação ao grupo de animais normais (grupo N), não submetido ao modelo mencionado, mas que apenas permaneceu nas mesmas condições que as dos demais (dependências do biotério, temperatura, ciclo luz-escuro e etc.). Por meio da ANOVA de duas vias, foi possível verificar que tanto o tratamento ($p < 0,05$) quanto o tempo ($p < 0,05$) influenciaram significativamente o peso dos animais.

O consumo de ração também foi semelhante entre os diferentes grupos, de acordo com a figura (8) apresentando queda apenas nos dias de aplicação da DEN e da hepatectomia (Figura 8).

Nesse experimento também foi monitorado o consumo de água de beber dos quatro grupos, segundo a figura (9).

O volume de água ou suco consumido teve comportamento semelhante ao consumo de ração, apresentando queda nos dias de aplicação de DEN e de hepatectomia (Figura 9).

Embora o consumo de ração e água tenham oscilações, esse comportamento é esperado segundo Kassie *et al.*(2003).

Figura 7: Curva de crescimento de ratos Wistar tratados com água (grupo AG= controle), goiaba vermelha (grupo GV) e goiaba branca (grupo GB), fornecidos na água de beber e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese.

Figura 8: Consumo de ração de ratos tratados com água (grupo AG= controle), goiaba vermelha (grupo GV) e goiaba branca (grupo GB), fornecidos na água de beber e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese.

Figura 9: Consumo de suco ou água de ratos tratados com água (grupo AG =controle), goiaba vermelha (grupo GV) e goiaba branca (grupo GB), fornecidos na água de beber e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese.

5.3.2 Análise morfométrica de LPN hepáticas GST-P positivas dos animais submetidos ao Protocolo Experimental 3

A Tabela 4 apresenta, por sua vez, os dados referentes à análise morfométrica de lesões pré-neoplásicas (LPN) GST-P positivas de fígados de ratos Wistar tratados, por meio da água de beber, com AG (grupo AG= controle), GV (grupo GV) ou GB (grupo GB) durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e promoção do modelo “DEN-HP” (Protocolo Experimental 3).

Tabela 4: Morfometria de lesões pré-neoplásicas LPN em fígado de ratos Wistar submetidos ao modelo “DEN-Hepatectomia Parcial” (Protocolo Experimental 3) e tratados por meio da água de beber, com GB, GV ou água durante as etapas de iniciação e promoção:

Grupos	n	Número de LPN/cm ² *	Área média das LPN (mm ²)*	Área agregada das LPN (mm ² /cm ²)*
AG	15	16,3 ± 7,8	0,024 ± 0,04	0,41 ± 0,23
GB	15	13,4 ± 5,85	0,022 ± 0,05	0,30 ± 0,18
GV	13	19,3 ± 6,7	0,026 ± 0,07	0,53 ± 0,25

AG = água; GV = goiaba vermelha; GB = goiaba branca.

n = número de animais; *média ± desvio-padrão da média.

Não se encontrou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos AG, GV e GB para os parâmetros de número, área média e área agregada de LPN.

Exemplo das LPN observadas encontra-se apresentada na **Figura 10**.

Figura 10. Digitalização de fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato Wistar tratado com água (grupo água, controle) durante 8 semanas consecutivas em período compreendendo as etapas de iniciação e promoção do modelo DEN-HP (Protocolo Experimental 3). Verificar a presença de foco de LPN marcada imunoistoquimicamente com anticorpo anti GST-P. Objetiva de 10X.

5.3.3 Exame histopatológico por meio de coloração pela hematoxilina e eosina (H&E) dos fígados dos animais submetidos ao Protocolo Experimental 3

O exame histopatológico dos animais tratados com AG (grupo AG= controle), GV (grupo GV) ou GB (grupo GB) durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as fases de iniciação e promoção do modelo DEN-HP (Protocolo Experimental 3) revelou o seguinte:

Nos animais do grupo normal (grupo N), constatou-se a presença de 3 focos de LPN constituídas por células vacuolizadas em um lobo hepático. Nesse grupo foram constatadas a discreta presença de proliferação de células ovais e também a escassa presença de infiltrado de células mononucleares periportais.

Nos animais do grupo AG (grupo AG= controle), constatou-se predominância de LPN constituídas por células claras, em segundo lugar em frequência foram observados focos vacuolizados e raros focos basofílicos. Nesse grupo foram consideradas escassas a presença de infiltrado de células mononucleares periportais assim como a de células ovais.

Nos animais do grupo GB, constatou-se a predominância de LPN constituídas por células acidofílicas e basofílicas, em segundo lugar em frequência foram observados raros focos de células vacuolizadas. Nesse grupo, a presença de células ovais foi considerada escassa, assim como o infiltrado de células mononucleares periportais.

Nos animais do grupo GV, constatou-se a predominância de LPN constituídas por células acidofílicas, em segundo lugar em frequência foram observados focos com células basofílicas seguido por menor número de células vacuolizadas. Nesse

grupo, a presença de células ovais foi considerada escassa, bem como o infiltrado de células mononucleares periportais.

5.3.4 Avaliação da apoptose hepática em animais submetidos ao Protocolo Experimental 3

A Tabela 5 apresenta os dados referentes à quantificação de corpúsculos apoptóticos (CA) hepáticos de ratos normais (grupo normal), ao redor das LPN e das próprias LPN de ratos Wistar tratados, por meio da água de beber, com AG (grupo AG= controle), GV (grupo GV) ou GB (grupo GB), durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e promoção do modelo do “DEN-HP” (Protocolo Experimental 3).

Tabela 5- Número de Corpúsculos Apoptóticos (CA) por mm² (no surrounding e na lesão) de área do corte de fígado de ratos Wistar submetidos ao modelo “DEN-HP” (**Protocolo Experimental 3**) e tratados, por meio da água de beber (bebedouro), com GB, GV ou AG durante as etapas de iniciação e promoção:

grupos	n	Corpúsculos no “Surrounding”*	Corpúsculos na LPN*
AG	15	0,69 ± 0,37	2,84 ± 5,94
GV	14	1,08 ± 0,55	3,80 ± 5,58
GB	15	1,40 ± 1,46	3,50 ± 6,81

AG = água; GV = goiaba vermelha; GB = goiaba branca.

n = número de animais; *média ± desvio-padrão da média.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os grupos AG, GV e GB quanto ao número de CA no surrounding e nas LPNs.

5.3.5 Determinação das concentrações de licopeno no fígado dos animais

A quantidades de licopeno do fígado de animais tratados por 8 semanas consecutivas, por meio de suco de GV ou GB a 10% na água de beber, foram $6,41 \pm 2,80 \mu\text{g/g}$ de tecido e $1,96 \pm 0,97 \mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente. Nos fígados dos ratos do grupo AG não foi detectado licopeno.

6 DISCUSSÃO

A ingestão de grandes quantidades de frutas e hortaliças é, geralmente, reconhecida por promover bom estado de saúde e menor risco de doenças, que incluem o estresse oxidativo como parte de suas patogêneses ou progressão, tais como a doença coronariana e câncer. Uma teoria prevalecente destaca a alta quantidade de antioxidantes, presentes em frutas e hortaliças como agentes que desempenham papel significativo na prevenção de doenças (Moller *et al.*, 2004).

Os compostos considerados responsáveis pelos efeitos protetores de uma dieta rica em frutas e hortaliças incluem carotenóides e vitaminas antioxidantes, tais como ácido ascórbico e tocoferóis. Entretanto, há a crescente evidência de que outros fitoquímicos possam contribuir, em maior ou menor grau, para a capacidade antioxidante de frutas ou hortaliças na sua forma integral. Nesse sentido, o enfoque tem sido dado sobre a importância de compostos fenólicos tais como as catequinas, ácidos fenólicos, flavonóides, proantocianidinas e antocianidinas (Kerry and Rice-Evans, 1999). Esses compostos exibem vários efeitos biológicos que incluem ação antibacteriana, antiinflamatória, antitrombótica e vasodilatadora além de possuírem alta atividade antioxidante e aprisionadora de radicais livres (Di Carlo *et al.*, 1999; Duthie *et al.*, 2000; Middleton and Kandaswami, 1994; Asgary *et al.*, 1999; Bestwick and Milne, 2001; Bahorun *et al.*, 1994; Bahorun *et al.*, 1996; Bahorun *et al.*, 2002).

O efeito antioxidante de compostos individuais, extratos, ou alimentos pode ser medido em experimentos de cultura de células, estudos em animais, ou estudos de intervenção em humanos (Moller *et al.*, 2004).

Dentre os vários protocolos de hepatocarcinogênese existentes para ratos, o modelo "DEN-Hepatectomia parcial" (DEN-HP), foi realizado com base em estudos

prévios conduzidos por Ito *et al.* (1988) para a detecção de agentes carcinogênicos e para o acesso aos compostos que possuem potencial quimiopreventivo, em relação ao fígado; e por Barbisan *et al.* (2002) para a avaliação da eventual influência quimiopreventiva de soluções aquosas do cogumelo *Agaricus blazei* em relação ao dano hepático e desenvolvimento de pré-neoplasia induzidos por uma dose de DEN, utilizada no modelo “DEN-Hepatectomia parcial”.

Assim, o objetivo do presente estudo foi de avaliar o potencial quimiopreventivo da GV e GB, quando administradas a ratos Wistar durante as etapas de iniciação e promoção do modelo de hepatocarcinogênese “DEN-Hepatectomia parcial” (DEN-HP). Além disso, com o intuito de caracterizar possíveis mecanismos de ação quimiopreventiva da GV e GB, foi avaliado o seu efeito sobre a apoptose.

Devido a estudos epidemiológicos terem demonstrado correlações inversas entre o consumo de grande quantidade de licopeno, notavelmente através de tomates e seus derivados, e a incidência de doenças tais como a doença coronariana e câncer; além de muitos estudos *in vitro* e *in vivo* tanto em humanos quanto em animais terem sido feitos para avaliação do efeito quimiopreventivo desse alimento, decidiu-se administrar a GV aos animais por esta apresentar semelhante perfil quanto a compostos bioativos. O tomate vermelho fresco possui a quantidade de licopeno que varia de 3.1-7.74 mg/100 g de peso fresco (Hadley *et al.*, 2002) além de vitamina C (160-240 mg/kg) e vitamina E (5-20 mg/kg) (Holland *et al.*, 1992) e uma variedade de flavonóides tais como a narigenina, e ácidos fenólicos tais como o ácido clorogênico (Davies e Hobson, 1981). A GV é uma fruta que possui quantidade também considerável de licopeno (5.4 mg/100 g de fruta fresca e 3.34 mg/ 100 mL de suco) (Hadley *et al.*, 2002) dentre outros carotenóides (total de 57-70

µg/g de fruta fresca) (Macra *et al.*, 1993), além de polifenóis, incluindo flavonóides e proantocianidinas (1.264 µg/g de fruta fresca) e vitamina C (722 µg/g de fruta fresca) (Luximon-Ramma *et al.*, 2003) (Quadro 1), que podem contribuir para sua atividade quimiopreventiva. Dentre os flavonóides, o flavonol mirecetina (549.5 mg/kg peso seco) e a flavona apigenina (579 mg/kg de peso seco) (Miean and Mohamed, 2001) foram encontrados em maior quantidade na goiaba (*Psidium guajava*). Decidiu-se administrar também a GB, por possuir quantidade considerável de polifenóis (2473 µg/g de fruta fresca) além vitamina C (1426 µg/g de fruta fresca) (Luximon-Ramma *et al.*, 2003) (Quadro 1), tais compostos bioativos, dentre outros, podem desempenhar papel importante contra o dano de componentes celulares provocados por radicais livres.

Primeiramente houve a necessidade da determinação do protocolo de administração da GV e GB aos animais. No Protocolo Experimental 1, utilizou-se a técnica de gavagem (entubação gástrica), técnica que propicia a administração de substâncias diretamente no estômago com dose precisa e tempo determinado (Classen, 1994), para tratar os animais com AG, GV ou GB (suspensão de frutas liofilizadas).

De acordo com a Tabela 1 e as Figuras 2 e 3, houve menor crescimento e consumo de ração dos animais dos grupos GV e GB em comparação aos animais do grupo AG (controle). Dessa forma, pôde-se concluir que a gavagem não é o melhor método para a administração das frutas.

Em seguida, com base em estudos prévios de administração de hortaliças e frutas, via oral, em estudos de quimioprevenção verificou-se que as formas de administração de alimentos mais utilizadas foram por meio de rações enriquecidas

ou, de chá ou suco na água de beber (Bresnick *et al.*, 1990; Amagase *et al.*, 1996; Rijken *et al.*, 1999; Qin *et al.*, 2000; Jia e Han, 2001; Kassie *et al.*, 2003).

Quadro 1: Alguns componentes identificados e quantificados na goiaba vermelha e na goiaba branca.

Amostra	Componentes	Quantidade (mg/100g fruta)	Referência
polpa GV	vitamina C	194	Barata-Soares <i>et al.</i> (2004)
GB	vitamina C	189	
extrato aquoso GV	flavonóides	112,9	Miean e Mohamed (2001)
polpa GV	licopeno	5,4	Hadley <i>et al.</i> (2002)
polpa e casca GV	polifenóis vitamina C	126,4 72,2	Luximon-Ramma <i>et al.</i> (2003)
polpa e casca GB	polifenóis vitamina C	247,3 142,6	

Observou-se atividade quimiopreventiva por parte do chá verde em modelo de carcinogênese hepática. Assim, ratos F-344 foram tratados com 0.5 % de chá verde na água de beber 2 semanas antes e durante as duas semanas de iniciação com aflatoxina B1, ou durante as 10 semanas de promoção com CCl₄. Os autores sugerem que a inibição do número de focos de lesão pré-neoplásica GST-P e GGT seria reflexo da inibição de proliferação celular pelo chá verde, na água de beber dos animais (Qin *et al.*, 2000).

Song e Milner (1999) avaliaram a atividade quimiopreventiva do alho em quatro estudos; no primeiro o alho foi administrado *in natura* amassado; no segundo o alho foi submetido a aquecimento no microondas; no terceiro o alho foi amassado e depois aquecido no microondas; no quarto o alho foi submetido a aquecimento no forno convencional; no modelo de câncer de mama. Assim, ratas Sprague-Dawley

foram tratadas, por meio de gavagem, com alho (nas diferentes formas, de acordo com o estudo) no veículo de óleo de milho (0.7 g/2 mL de óleo de milho) durante as 2 semanas antes da iniciação por dimetilbenz(a)antraceno (DMBA). Nessa concentração, por meio de gavagem em óleo de milho, o alho, de uma forma geral, foi efetivo com relação ao bloqueio da formação de aduto de DNA induzido por DMBA.

Bresnick *et al.* (1990) avaliaram a atividade quimiopreventiva de couve no modelo de câncer de mama. Assim, ratas Sprague-Dawley foram tratadas, por meio de ração, com couve liofilizada (5 e 10%) por 24 semanas após a iniciação por N-metil-N-nitrosourea (MNU). Nessa concentração, por meio da ração, a couve liofilizada foi capaz de diminuir a incidência de tumorigênese de mama em ratos iniciados por MNU.

Em outro estudo semelhante, Rijken *et al.* (1999) investigaram os efeitos do consumo de ração suplementada com hortaliças liofilizadas (ervilha, espinafre, brócolis e couve) (10% de cada hortaliça para seu respectivo grupo, ou 2.5% de cada um numa mistura) por 2 semanas antes da iniciação durante as 12 semanas seguintes. O modelo utilizado foi o de câncer cólon-retal iniciado por azoximetano (AOM) em ratos Sprague-Dawley. Nessas concentrações, tanto as hortaliças individualmente administradas quanto a mistura delas liofilizadas na ração, foram capazes de inibir o número de focos de criptas aberrantes, induzidos por AOM.

No estudo conduzido por Amagase e Milner (1993) demonstrou-se que a adição de alho liofilizado na ração (20 g/kg) de ratas Sprague-Dawley, administrada durante 2 semanas consecutivas antes da iniciação, reduziu a ligação de metabólitos de DMBA ao DNA de célula da mama. Assim, o alho liofilizado na ração foi capaz de reduzir a incidência de tumores de mama induzidos por DMBA.

Num estudo mais recente, avaliou-se o potencial quimiopreventivo de vegetais crucíferos (couve de bruxelas ou couve vermelha) no modelo de hepatocarcinogênese e câncer de cólon iniciados por 3-metilimidazo[4,5-f]quinolina (IQ). Os ratos F-344 foram iniciados em 10 dias alternados, recebendo ao mesmo tempo, suco de couve de Bruxelas ou couve vermelha na água de beber (5% v/v) 5 dias antes e após a iniciação com IQ, por um período total de 16 semanas. Assim, a administração da couve de Bruxelas resultou na inibição do número de lesões pré-neoplásicas em ambos, no cólon e fígado, além de diminuir o tamanho das LPN GST-P positivas, mas esse efeito não foi verificado quanto aos focos de criptas aberrantes. Quanto à administração de couve vermelha, houve redução do tamanho das LPN GST-P positivas e o seu número foram levemente inibidos, e não houve efeito algum sobre o cólon (Kassie *et al.*, 2003).

Em todos os estudos, anteriormente descritos, os animais não sofreram alterações no crescimento ou consumo de ração quando comparados ao grupo controle.

A opção feita para a administração da GV e GB, no Protocolo Experimental 2, na forma de suco por meio da água de beber, foi fundamentada no estudo de quimioprevenção realizado por Kassie *et al.* (2003), que forneceu couve de Bruxelas ou couve vermelha a 5% e obteve bons resultados na quimioprevenção da carcinogênese de fígado e cólon.

Assim, prosseguiu-se com a observação, durante 24 horas (período de troca dos sucos), do comportamento de sedimentação dos sucos, nas diferentes concentrações da GV e GB. Observou-se nos sucos a 10% melhor comportamento. Sendo assim, seguiu-se, a partir dessas observações com a continuação da execução do Protocolo Experimental 2 para a verificação da aceitação dos sucos

pelos animais. Por meio da Tabela 2 e Figuras 4, 5 e 6 verifica-se que não houve diferenças estatisticamente significativas quanto ao crescimento, consumo de ração, consumo de suco ou água dos grupos GV e GB em relação ao grupo AG respectivamente. Isso indica uma boa aceitação dos sucos pelos animais e que possivelmente não seria necessária a introdução de um grupo “pair feeding”.

Seguiu-se com a execução do Protocolo Experimental 3, no qual se avaliou o potencial quimiopreventivo da GV e GB quando administradas, como suco na água de beber, durante 8 semanas consecutivas a ratos Wistar, durante a etapa de iniciação e promoção do modelo DEN-HP.

De acordo com a Tabela 3, Figuras 7, 8 e 9 pode-se verificar que não houve diferença significativa entre os animais dos grupos GV, GB e AG quanto ao seu desenvolvimento; e que o consumo de ração e de suco dos animais dos mesmos grupos foi similar. O que indica que os sucos não apresentaram efeito tóxico como efeito somatório à iniciação e promoção promovidos pelo modelo DEN-HP.

De acordo com a Tabela 4, é possível se constatar que o suco de GV ou GB, não foi capaz de inibir o número, área agregada, ou área média das LPN GST-P positivas.

Breinholt *et al.* (2003) investigaram o efeito da administração, a ratos F-344, de 0.05 g de licopeno, 0.1 g de quercetina, 0.001 g de resveratrol, 0.05 g de licopeno e 0.1 g de quercetina e 0.2 g 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-quinolina (IQ)/kg de ração, por 10 semanas no modelo de câncer hepático e de cólon. Todos os antioxidantes e a combinação dos antioxidantes aumentaram significativamente o nível de dano no DNA de linfócitos, numa dimensão similar ao efeito induzido por IQ. Foram detectados LPN GST-P positivas em animais expostos à quercetina, ao licopeno e à combinação dos dois. Isso sugere que o licopeno e a quercetina, como

compostos puros, administrados por um tempo prolongado podem agir ativamente no papel de iniciação e promoção do câncer. Os flavonóides já foram relatados como indutores de dano no DNA *in vitro* (Pool-Zobel *et al.*, 2000; Kulling *et al.*, 1999), entretanto esse estudo é o primeiro que reporta efeito de dano no DNA *in vivo* promovido por flavonóides e carotenóide.

No estudo, com modelo espontâneo de câncer hepático, feito por Watanabe *et al.* (2001), ratos Long-Evans Cinnamon (LEC) receberam 0.005% (p/p) de licopeno (óleo-resina de tomate enriquecido com licopeno, 13%) na ração durante 70 semanas e observou-se que não houve redução da área agregada de carcinoma hepatocelular, ou da área agregada de LPN GST-P positivas, ou do seu número. Os autores acreditam que neste caso, a habilidade antioxidante do carotenóide não foi suficientemente capaz de resultar no efeito inibitório de hepatocarcinogênese.

Após 40 semanas de administração de 50 ppm de licopeno, na água de beber, houve a diminuição da incidência de carcinoma hepático em camundongos machos C3H/He depois de tratamento combinado de 1-óxido de 4-nitroquinolina e glicerol (Nishino, 1997).

Toledo *et al.* (2003) em seu estudo, avaliou o efeito do licopeno no modelo de hepatocarcinogênese em ratos Wistar. Em dias alternados, o licopeno foi administrado (70 mg/kg de rato), por meio da gavagem em óleo de milho, 2 semanas antes da iniciação por dietilnitrosamina e durante as 6 semanas seguintes (período no qual ocorre a seleção/promoção promovido por 2-AAF e seguido por hepatectomia parcial). Assim, o licopeno foi capaz de diminuir o número de LPN GST-P positivas, além de diminuir o dano no DNA.

No estudo conduzido por Kweon *et al.* (2003), ratos Sprague-Dawley foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese induzido por DEN. A um grupo de

animais foi administrada a ração, suplementada com 15% de extrato de uva liofilizado, durante as 11 semanas de experimento. Ao outro grupo foi administrada a mesma ração suplementada, após a iniciação por DEN. Assim, foram inibidas a formação de focos de glutathione placentária (GSH), de focos de LPN GST-P positivas, a peroxidação lipídica e a atividade da enzima ácido graxo sintase

Matos *et al.* (2001), em seu estudo, administraram a ratos Wistar o licopeno puro (10 mg/kg/dia), por meio de injeções intra-peritoneais, por 5 dias. Em seguida, submeteram esses animais a iniciação por ascorbato de Fe-NTA, no modelo de carcinogênese hepática. O sacrifício se deu após 3 ou 24 hrs de administração do carcinogênico. Assim, o tratamento prévio com o licopeno protegeu o fígado, significativamente, contra o dano oxidativo biomolecular e também o protegeu contra alterações histopatológicas.

Sarmishtha *et al.* (2000), em seu estudo com modelo de câncer hepático, administraram o suco de tomate a ratas albinas suíças o suco de tomate na concentração de 1:2, simultaneamente com a administração de 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA), em dias alternados por 2 meses. Assim, o licopeno foi capaz de inibir a peroxidação lipídica no fígado dos animais.

Gann e Khachik (2003), em sua revisão, mencionam o estudo de Boileau *et al.* (2003) como um novo estudo importante e intrigante. Talvez pela grande importância, dada pelo estudo, sobre a possibilidade da quimioprevenção ser melhor alcançada através da administração de alimentos na sua forma integral do que na forma de compostos isolados. Nesse estudo, cujo modelo é o de carcinogênese de próstata induzido por MNU em ratos, a administração de ração com tomate liofilizado inibiu o desenvolvimento de câncer de próstata em relação à ração controle (não

suplementada), enquanto a administração de ração suplementada com o licopeno sintético puro não produziu efeito algum em relação à ração não suplementada.

Agentes quimiopreventivos também atuam na carcinogênese induzindo o processo de apoptose (Sun, 2001; Greenwald, 2002). Dessa forma, decidiu-se também no presente estudo por avaliar a apoptose nas áreas hepáticas sem alterações morfológicas ao redor das LPN, bem como nas próprias LPN.

De acordo com a Tabela 5, não foram observadas diferenças entre os grupos GV ou GB e AG quanto ao número de CA presentes nas áreas da LPN, bem como nas áreas ao redor das mesmas sem alterações morfológicas. Confirmando assim ausência de atividade quimiopreventiva.

No presente estudo, houve a quantificação do licopeno no fígado dos animais tratados com os sucos de GV ou GB por 8 semanas consecutivas, 2 semanas antes e durante as etapas de iniciação e promoção do modelo de hepatocarcinogênese DEN-HP. Assim, após a administração de suco de GV a média verificada de consumo de licopeno pelos animais foi de 0.087 mg/100 g de animal/dia, o que resultou num acúmulo de licopeno no tecido hepático de 6.41 μ g/g tecido. Em um outro estudo semelhante, feito por Toledo *et al.* (2003), foi administrado a ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH, o licopeno (7 mg/100g de rato), através de gavagem em óleo de milho, em dias alternados, por 8 semanas consecutivas. O acúmulo de licopeno hepático foi de 25.8 μ g/g de tecido no final do estudo. Assim, pode-se verificar que houve uma diferença de acúmulo de licopeno hepático entre os dois estudos. O licopeno administrado através do suco de GV foi 10 vezes mais acumulado no fígado do que o licopeno administrado em maior quantidade, através da gavagem, na forma isolada em óleo de milho. Fatores tais como características estruturais do carotenóide, a quantidade de gordura dietética,

tipos de ácidos graxos, fibra, e outros componentes do alimento podem influenciar na quantidade de carotenóides das micelas e subsequente transferência para a mucosa intestinal (Parker, 1996). A biodisponibilidade do licopeno também pode ser afetada pela dosagem e pela presença de outros carotenóides, tal como o β -caroteno: Johnson *et al.* (1997) sugerem, em seu trabalho, que a biodisponibilidade do licopeno aumentou quando foi ingerido por ratos com β -caroteno. Cohen (2002) reportou em sua revisão que as concentrações plasmáticas de licopeno em ratos alimentados com dieta à base de grãos, foram menores em comparação com os ratos alimentados com dieta à base de caseína, sendo ambas suplementadas com licopeno. Isso sugere que a matriz, a qual está incorporado o licopeno, é um determinante importante para a sua absorção. Geralmente o licopeno de tomates é relativamente mais resistente à degradação comparado ao licopeno puro, em alguns modelos de estudo. Outros constituintes do tomate podem ajudar a estabilizar o licopeno durante o processamento (Takeoka *et al.*, 2001) (Quadro 2).

Narisawa *et al.* (1998), em seu estudo, ratas F-344/NSIc foram submetidas ao modelo de câncer de cólon iniciado por MNU. No segundo experimento, um grupo de ratas recebeu suco de tomate na diluição 1:2, 17 ppm de licopeno e outro recebeu o suco de tomate na diluição 1:14, 3.4 ppm de licopeno, na água de beber. O acúmulo de licopeno no fígado, após 35 semanas de administração dos sucos de tomate, foi de 0.7 $\mu\text{g/g}$ de tecido e de 0.09 $\mu\text{g/g}$ de tecido para os respectivos grupos. Diferentemente do presente estudo, onde o suco de GV tinha diluição 5 vezes maior (1.8 vezes menos licopeno) e administrado em menor tempo, propiciou o acúmulo de licopeno no fígado 8.6 vezes maior do que no caso do estudo com sucos de tomate a 1:2 e administrado por período mais prolongado. Em relação ao suco de tomate a 1:14 administrado por longo período, o suco da GV é 1.42 vezes

mais concentrado (2.5 vezes mais licopeno) e o acúmulo após menor tempo de administração de licopeno no fígado foi 66.7 vezes maior. A razão disso pode ser que o modelo experimental de indução de câncer de cólon tenha prejudicado a absorção de licopeno através da mucosa intestinal, prejudicando conseqüentemente o seu acúmulo hepático (Quadro 2).

Quadro 2: Comparação entre o Estudo Presente e outros estudos nos quais o licopeno foi administrado a ratos em diferentes formas de administração.

Rato	Modelo	Biomarcador	Alimento/ Adm.	Tempo de Estudo em semanas	Dose de Licopeno (mg/100g rato/dia)	Concent.Hepática de Licopeno (µg/g figado)	Refer.
Wistar	Hepatocarcinog. (DEN-HP)	LPN GST-P+	GV/água de beber	8	0.087	6.41	Presente Estudo
Wistar	Hepatocarcinog. (RH)	LPN GST-P+ e Danos no DNA	Isolado em óleo/gavagem	8	3.5	25	Toledo <i>et al.</i> (2003)
F-344/NS1c fêmea	Câncer de Cólon (MNU)	Tumor de Cólon	Tomate/água de beber	35	0.04 e 0,18	0.09 e 0,7	Narisawa <i>et al.</i> (1998)
F-344	Saudável	_____	Isolado/ração	8	0.039	10.89	Jain <i>et al.</i> (1999)
F-344	Saudável	_____	Óleo-resina tomate/gavagem	9	0.46	7.63	Ferreira <i>et al.</i> (2000)
F-344	Saudável	_____	Óleo-resina tomate/gavagem	10	0.14 ↓ 3.5	42 ↓ 120	Zhao <i>et al.</i> (1998)

Jain e seus colaboradores (1999) indicam o acúmulo médio de licopeno no tecido hepático de ratos F-344 de 10.89 $\mu\text{g/g}$ de tecido, após suplementação de licopeno de 10 ppm/dia na ração por 2 meses consecutivos. Em relação ao estudo com suco de GV, o licopeno foi administrado em quantidade 10 vezes menor na ração, durante o mesmo período de tempo e foi acumulado no fígado 1.8 vezes mais. A razão disso poderia ser que o licopeno presente na ração sofreu maior processamento, havendo maior liberação do licopeno da matriz alimentar também devido à presença de lipídeos dietéticos e maior isomerização da conformação all-trans para cis induzida por calor, aumentando a biodisponibilidade do licopeno, promovendo a sua maior absorção intestinal (Rao and Agarwal, 1999; Stahl e Sies, 1992). Além do fato de que provavelmente os animais saudáveis possuam maior capacidade de armazenamento hepático de licopeno do que os animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese. Com relação a isso, há descrições de que as concentrações hepáticas de carotenóides estão muito reduzidas em pacientes com cirrose (Collins e Horváthová, 2001) (Quadro 2).

No estudo realizado por Ferreira *et al.* (2000), submeteram ratos F-344 à administração de licopeno 4.6 mg/kg de animal por dia no óleo-resina de tomate em óleo de milho, através de gavagem durante 9 semanas. A média de acúmulo resultante de licopeno no tecido hepático foi de 14213 nmol/g de tecido. Em relação ao estudo com o suco de GV, foi administrado 4.6 vezes mais licopeno na gavagem com extrato de carotenóides em óleo de milho, e o acúmulo hepático de licopeno do rato foi 1.3 vezes maior. Talvez a razão disso seja o fato que o licopeno administrado, por meio do suco de GV, possa estar mais biodisponível devido à presença de outros componentes tais como outros carotenóides, polifenóis, vitaminas e fibras que se sobrepõem à maior biodisponibilidade propiciada pela

presença de lipídeo, outros carotenóides, pelo maior processamento e menor exposição à fatores de degradação do licopeno na mistura de carotenóides do extrato de tomate na forma de óleo-resina em óleo de milho, na gavagem (Quadro 2).

Zhao *et al.* (1998), submeteram ratos F-344 à administração várias concentrações diferentes de uma mistura de carotenóides em óleo-resina de tomate, adicionada à ração, por 10 semanas consecutivas. As quantidades correspondentes de licopeno variaram de 0.09-2.3 mM/kg de ração e o acúmulo médio de licopeno no fígado dos animais variou entre 42-120 µg/g de tecido. Em relação ao estudo com o suco de GV, a quantidade de licopeno administrada através da ração suplementada com extrato de carotenóides em óleo-resina de tomate foi entre 1.4-35 vezes maior, e o acúmulo hepático resultante foi 3.6-20 vezes maior, após duas semanas adicionais de administração. A maior proporção de acúmulo de licopeno no fígado nos ratos do estudo de Zhao *et al.* (1998), pode estar relacionada ao fato do maior processamento ao qual o licopeno foi submetido para ser incorporado à ração, além da maior presença de lipídeos do óleo-resina de extrato de tomate e do animais serem saudáveis (Quadro 2).

Assim, de acordo com os estudos acima, supõe-se que haja acúmulo de licopeno hepático, em ordem decrescente, a partir da sua administração sob a forma de ração, depois através da água de beber e por último, através de gavagem.

Quanto à ausência de inibição de LPN GST-P positivas, ou indução de apoptose pela GV ou GB, esses resultados podem ser reflexo de hipóteses dadas a outros tipos de frutas. Assim, por exemplo, segundo Takeoka *et al.* (2001) mudanças nas atividades anti-oxidantes de produtos do tomate são complexas e dependem dos compostos específicos que estão sendo estudados. Resultados iniciais sugerem

que a perda de atividade antioxidante está associada à diminuição da concentração de licopeno durante o processamento que, por sua vez, pode estar associada ao aumento da atividade anti-oxidante de outros compostos, especialmente dos polifenóis.

Cohen (2002), em sua revisão, relata algumas razões para a discrepância de resultados entre dois trabalhos que fizeram uso do modelo de carcinogênese de mama induzido em ratos, submetidos à administração de extrato de carotenóides. Assim, as discrepâncias se deveram às diferentes formas de administração (por meio de injeção ip ou na dieta) e/ou diferentes agentes carcinogênicos utilizados (DMBA ou NMU), diferentes raças dos animais (Sprague-Dawley não-inato ou F-334 inato).

Diferenças e semelhanças, observadas em vários modelos experimentais se traduzem em expectativas quanto a diversos mecanismos, possivelmente quimiopreventivos, contra a indução de eventos genotóxicos. Esses podem ser influenciados por vários componentes de alimentos que, por sua vez, deveriam exercer efeitos quimiopreventivos (Edenharder *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos desse estudo, até o presente momento, podem também refletir o tempo curto de sua duração e/ou a baixa quantidade de GV e GB administradas aos animais que, por sua vez, podem influenciar nas capacidades de concentrações hepáticas dos compostos bioativos dessas frutas e portanto, nas possíveis atividades quimiopreventivas por estas exercida nos animais.

7 CONCLUSÃO

As GV e GB não apresentaram efeito quimiopreventivo quando administradas a ratos Wistar submetidos ao presente modelo de hepatocarcinogênese.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, S., RAO, A. V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases – a review. **CMAJ**, no. 6, v.163, p. 739-744, 2000.
- AMAGASE, H., SCHAFFER, E. M., MILNER, J. A. Dietary components modify the ability of garlic to suppress 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary DNA adducts. **J. Nutr.**, v. 126, p. 817-824, 1996.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts and figures, 2004. **American Cancer Society**, Atlanta, 2004.
- ANDERSON, D., TIAN-WEI, Y., Mc GREGOR, D. B. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. **Mutagenesis**, v. 13, p. 539-555, 1998.
- ARNAUD, J., FORTIS, I., BLACHIER, S., KIA, D., FAVIER, A. Simultaneous determination of α -topherol and β -carotene in serum by isocratic high performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 572, p. 103-116, 1991.
- ASGARY, S., NADERI, G., SARRAFZADEGAN, N., GHASSEMI, N., BOSHTAM, M., RAFIE, M., AREFIAN, A. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. **Pharm. Acta Helv.**, v. 73 , p. 223-226, 1999.
- BANNASCH, P., MÜLLER, H. A. Lichtmikroskopische untersuchungen über die wirkung von N-nitrosomorpholin auf die leber von ratte und maus. **Arzneim. Forsch.**, v. 14, p. 805-814, 1964.
- BANNASCH, P. The cytoplasm of hepatocytes during carcinogenesis. Light and electron microscopic investigations of the nitrosomorpholine-intoxicated rat liver. **Rec. Res. Cancer Res.**, v. 19, p. 1-100, 1968.
- BANNASCH, P., MAYER, D., HACKER, H. J. Hepatocellular glycogenosis and hepatocarcinogenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 605, p. 217-245, 1980.
- BANNASCH, P. Preneoplastic lesions as end points in carcinogenecity testing. I. Hepatic preneoplasia. **Carcinogenesis**, v. 7; p.689-95, 1986.
- BANNASCH, P., ZERBAN, H. Tumours of the liver. In: Pathology of Tumors in Laboratory Animals. V. S. TURUSOV, U. MOHR, eds. Lyon, **IARC Sci. Pub.**, v. 1, p. 199-240, 1990.
- BANNASCH, P. Cytology and citogenesis of neoplastic (hyperplastic) hepatic nodules. **Cancer Res.**, v. 36, p. 2555-2562, 1976.
- BARATA-SOARES, A. D., GOMEZ, M. L. P. A., MESQUITA, C. H., LAJOLO, F. M. Ascorbic acid biosyntesis: a precursor study on plants. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 16, p. 147-154, 2004.

- BARBISAN, L. F., SCOLASTICI, C., MIYAMOTO, M., SALVADORI, D. M. F., RIBEIRO, L. R., EIRA, A. F., CAMARGO, J. L. V. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. **J. Ethnopharmacol.**, v. 2, p. 295-308, 2003.
- 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. **Genet. Mol. Res.**, 83, p.25-32, 2002.
- BEECHER, G. Phytonutrient's role in metabolism:Effect on resistance to degenerative processes. **Nutr. Rev.**, no 57, no. 9, p. 53-56, 1999.
- BENCHIMOL, S. p53-dependent pathways of apoptosis. **Cell Death Differ.**, p. 1049-51, 2001.
- BENHAMICHE, A. M., FAIVRE, C., MINELLO, A., CLINARD, F., MITRY, E., HILTON, P., FAIVRE, J. Time trends and age-period-cohort effects on the incidence of primary liver cancer in a well-defined French population. **J. Hepatol.**, v. 29, p. 802-6, 1998.
- BENJAMIN, H. S. L., PADMA, P. T., JEFFREY, M. T. *Allium sativum*: (garlic) and cancer prevention. **Int. Vitam. Nutr. Res.**, v. 10, p. 937-948, 1990.
- BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Mol. Aspects Med.**, v. 21, p. 167-223, 2000.
- BESTWICK, C. S., MILNE, L. Quercetin modifies reactive oxygen levels but exerts only partial protection against oxidative stress within HL-60 cells. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1528, p. 49-59, 2001.
- BISHOP, J. M. Molecular themes in oncogenesis. **Cell**, v. 64, p. 235-248, 1991.
- BLOCK, G. Fruit , vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutr. Cancer**, v. 18, p. 1-29, 1992.
- BOHR, V. A., PHILLIPS, D. H., HANAVALD, P.C. Heterogeneous DNA damage and repair in the mammalian genome. **Cancer Res.**, v. 54, p.6426-36, 1994.
- BOILEAU, T. W., LIAO, Z., KIM, S., LEMESHOW, S., ERDMAN, J. W., CLINTIN, S. K. Prostate carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed tomato powder, lycopene, or energy-restricted diets. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 95, p. 1578-86, 2003.
- BREINHOLT, V. M., MOLCK, A-M., SVENDESEN, G. W., DANESHVAR, B., VINGGAARD, A. M., POULSEN, M., DRAGSTED, L. O. Effects of dietary antioxidants and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline (IQ) on preneoplastic lesions and on oxidative damage hormonal status, and detoxification capacity in the rat. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 1315-1323, 2003.

- BRESNICK, E., BIRT, D. F., WOLTERMAN, K., WHEELER, M., MARKIN, R. S. Reduction in mammary tumorigenesis in the rat by cabbage and cabbage residue. **Carcinogenesis**, v. 11, p. 1159-1163, 1990.
- BURSCHE, W., GRASL-KRAUPP, B., ELLINGER, A., TOROK, L., KIENZL, L. H., MULLAUER, L., SCHULTE-HERMANN, R. Active cell death: Role in hepatocarcinogenesis and subtypes. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 72, p. 669-75, 1994.
- CHAN, H. T. Passion fruit, Papaya and guava juices. In: NAGY, S., CHEN, C. S., SHAW, P. E. Fruit juice processing technology. Agscience, Auburndale, p. 334-377, 1993.
- CHAPKIN, R. S., LUPTON, J. R. Colonic cell proliferation and apoptosis in rodent species: modulation by diet. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 470, p. 105-118, 1999.
- CLINTON, S. K. Lycopene: Chemistry, biology, and implications for human health and disease. **Nutr. Rev.**, v. 56, p. 35-51, 1998.
- COBLEY, L. S. An Introduction to the Botany Tropical Crops, 2nd ed. Longman, New York, 1976.
- COHEN, L. A. A review of animal model studies of tomato carotenoids, lycopene, and cancer chemoprevention. **Exp. Biol. Med.**, v. 227, p.864-868, 2002.
- COLLINS, A. R., HORVÁTHOVÁ, E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 29, p. 337-341, 2001.
- COLUMBANO, A., LEDDA-COLUMBANO, G. M., CONI, P. P., FAA, G., LIGUORI, C., SANTA CRUZ, G., PANI, P. Occurrence of cell death (apoptosis) during the involution of liver hyperplasia. **Lab. Invest.**, v. 52, p. 670-5, 1985.
- COLUMBANO, A. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological process *in vivo*. **J. Cell. Biochem.**, v. 58, p. 181-90, 1995.
- CONNEY, A. H. Enzyme induction and dietary chemicals as approaches to cancer chemoprevention: the seventh DeWitt S. Goodman lecture. **Cancer Res.**, v. 63, p. 7005-7031, 2003.
- DAVIES, J. N. and HOBSON, G. E. Constituents of tomato fruit, the influence of environment, nutrition and genotype. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.**, v. 15, p. 205-280, 1981.
- DEAL, F. H., RICHARDSON, F. C., SWENBERG, J. A. Dose response of hepatocyte replication in rats following continuous exposure to diethylnitrosamine. **Cancer Res.**, v. 49, p. 6985-8.
- DEPARTMENT OF HEALTH AND TUMOR SERVICES. The health consequences of smoking: cancer. Public Health Service, 1982.

- DI CARLO, G., MASCOLO, N., ICE, A. A., CAPASSO, F. Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci.**, v. 65, p. 337-353, 1999.
- DIPLOCK, A. T., CHARLEUX, J-L, CROZIER-WILLI, G., KOK, F. J., RICE-EVANS, C., ROBERFROID, M., STAHL, W., VINA-RIBES, J. Functional food science and defence against reactive oxygen species. **Br. J. Nutr.**, v. 80, p. S77-S112, 1998.
- DIPPLE, A. DNA adductes of chemical carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 437-41, 1995.
- DRAGAN, Y. P., CAMPBELL, H. A., BAKER, K., VAUGHAN, J., MASS, M., PITOT, H.C. Focal and non-focal hepatic expression of placental glutathione S-transferase in carcinogen-treated rats. **Carcinogenesis**, v. 15, p. 2587-2591, 1994.
- DRAGAN, Y. P., RIZUI, T., XU, Y. H. Na initiation-promotion assay in rat liver as a potential complement to the 2-year carcinogenesis bioassay. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 16; p. 525-547, 1991.
- DUTHIE, G. G., DUTHIE, S. J., KYLE, J. A. M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutr. Res. Rev.**, v. 13, p. 79-106, 2000.
- EDENHARDER, R., FRANGART, J., HAGER, M., HOFMANN, P., RAUSCHER, R. Protective effects of fruits and vegetables against *in vivo* clastogenicity of cyclophosphamide or benzo(a)pyrene in mice. **Food Chem. Toxicol.**, v. 36, p. 637-645, 1998.
- EDWARDS, J. T., MACDONALD, G. A. Hepatocellular carcinoma. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 16, p. 275-81, 2000.
- EL-SERAG, C. R., JATKOE, T., MADORE, S. J., HOLT, A. L., FARNHAM, P. J. Expression profiling and identification of novel genes in hepatocellular carcinomas. **Oncogene**, v. 20, p. 2704-12, 2001.
- FAHEY, J. W., BEVERLY, A. C., RUSSEL, R. M. Methods for assessing the biological effects of specific plant components. **Nutr. Rev.**, V. 57, pp.534-540, 1999.
- FARBER, E. The sequential analysis of liver cancer induction. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 605, p. 149-166, 1980.
- FARBER, E., CAMERON, R. The sequential analysis of cancer development. **Adv. Cancer Res.**, v. 31, p. 125-226, 1980.
- FARBER, E. Chemical carcinogenesis. **N. Eng. J. Med.**, v. 305, p. 1379-89, 1981.
- FARBER, E. Pre-cancerous steps in carcinogenesis. Their physiological adaptive nature. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 738, p. 171-180, 1984.
- FARBER, E., SARMA, D. S. R. Hepatocarcinogenesis: A dynamic cellular perspective. **Lab. Invest.**, v. 56, p. 4-22, 1987.

- FARBER, E. Clonal adaptation during carcinogenesis. **Biochem. Pharmacol.**, v. 39, p. 1837-46, 1990.
- FARBER, E. Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. **Cancer Res.**, v. 55, p. 3759-3762, 1995.
- FERREIRA, A. L. A., YEUM, K.; LIU, C., SMITH, D., KRINSKY, N. I., WANG, X., RUSSEL, R. M. Tissue distribution of lycopene in ferrets and rats after lycopene supplementation. **J. Nutr.**, v. 130, p. 1256-1260, 2000.
- FINNBERG, N. The attenuation of the p53 response to DNA damage in rodent liver preneoplastic enzyme-altered foci. Stockholm, 2003, 50 p. [Mastered Tesis, The Institute of Environmental Medicine-Karolinska Instituted].
- FONSECA, H., NOGUEIRA, J. N., MARCONDES, A. M. S. Ascorbic acid and β -carotene contents of Brazilian fruits and vegetables). **Arch. Latinoamer. Nutr.**, v. 19, p. 9-16, 1969.
- GANN, P. H., Khachik, f. Tomatoes or lycopene versus prostate cancer: is evolution anti-reductionist? **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 91, p. 1563-1565, 2003.
- GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 91, p. 317-331, 1999.
- GO, V. L. W., BUTRUM, R. R., WONG, D. A. Diet, nutrition, and cancer prevention: The postgenomic era. **J. Nutr.**, v. 133, p. 3830S-3836S, 2003.
- GOLDSWORTHY, T., CAMPBELL, H. A., PITOT, H. C. The natural history and dose-response characteristics of enzyme-altered foci in rat liver following phenobarbital and diethylnitrosamine administration. **Carcinogenesis**, v. 5, p. 67-71, 1984.
- GONZALES-ABREU, A., MOREIRA, T., VILLEGAS, M. I. Preliminary determination of the main carotenes in several fruit pulps. **Rev. Cienc. Biol.**, v. 16, p. 1-6, 1985.
- GRANA, X., REDDY, E. P. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). **Oncogene**, v. 11, p. 211-219, 1995.
- GRASL-KRAUPP, B., BURSCH, W., RUTTAKAY-NEDECKY, B., WAGNER, A., LAUER, B., SHULTE-HERRMANN, R. Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogens in rat liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 9995-9999, 1994.
- GREENWALD, P. Cancer chemoprevention. **BMJ.**, v. 324, p. 714-718, 2002.
- GROSS, J. Pigments in fruits. Academic Press, London, p. 143-144, 1987.
- GRUDDY, S. M. Recent Nutrition Research, implications for foods of the future. **An. Med.**, v. 23, p. 187-193, 1991.

- GUO, C., YANG, J., WEI, J., LI, Y., XU, J., JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutr. Res.**, v. 23, p. 1719-1726, 2003.
- HADLEY, E. C., MILLER, E. C., SCHWARTZ, S. J., CLINTON, S. K. Tomatoes, lycopene, and prostate cancer: progress and promise. **Exp. Biol. Med.**, v. 227, p. 869-880, 2002.
- HARRIS, C. C. p53 Tumor suppressor gene involvement in human carcinogenesis. Symposium on Cell Proliferation and Chemical **Carcinogenesis**. Research Triangle Park, N C, 1992.
- HASLER, C. M. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food Tech.**, v. 52, p. 63-70, 1998.
- HIGGINS, G. M., ANDERSON, R. M. Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. **Arch. Pathol.**, v. 12, p. 186-202, 1931.
- HOLLAND, B., WELCH, A. A., UNWIN, I. D., BUSS, D. H., PAUL, A. A. Southgate DAT. In: The composition of Foods, Fifth revised and extended edition. MacCance and Widdowson's, UK, 1992.
- HOLLMAN, P. C. H., HERTOOG, M. G. L., KATAN, M. B. Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 24, p. 785-789, 1996.
- HSU, S. N., RAINE, L., FANGER, H.A. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 75, p. 734-8, 1981.
- IKEDA, K., SAITOH, S., ARASE, Y., CHAYAMA, K., SUZUKI, Y., KOBAYASHI, M., TSUBOTA, A., NAKAMURA, I., MURASHIMA, N., KUMADA, H., KAWANISHI, M. Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: a long-term observation study of 1,643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis. **Hepatology**, v. 29, p. 1124-30, 1999.
- IMAI, T., MASUI, T., ICHINOSE, M., NAKANISHI, H., YANAI, T. *et al.* Reduction of glutathione s-transferase p-form m-RNA expression in remodeling nodules in rat liver revealed by in situ hybridization. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 545-551, 1997.
- INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA (São Paulo, SP). **Valor da Produção**. Disponível em: <www.iea.sp.gov>. Acesso em: 15 out. 2002.
- ITO, N. *et al.* Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats. **Rev. Mutation Res.**, v. 462, p. 209-217, 2000.
- ITO, N., HASEGAWA, R., IMAIDA, K., HIROSE, M., SHIRAI, T. Medium-term liver and multi-organ carcinogenesis bioassay for carcinogens and chemopreventive agents. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 48, p. 113-119, 1996.

- ITO, N., TSUDA, H., TATEMATSU, M., INOUE, T., TAGAWA, Y., AOKI, T., UWAGAWA, S., KAGAWA, M., OGISO, T., MASUI, T., IMAIDA, K., ASAMOTO, 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.
- ITO, N., TAMANO, S., SHIRAI, T. A medium-term rat liver bioassay for rapid *in vivo* detection of carcinogenic potential of chemicals. **Cancer Sci.**, v. 94, p. 3-8, 2003.
- JAIN, C. K., AGARWAL, S., RAO, V. The effect of dietary lycopene on bioavailability, tissue distribution, *in vivo* antioxidant properties and colonic preneoplasia in rats. **Nutr. Res.**, v. 19, p. 1383-1391, 1999.
- JIA, X., HAN, C. Effects of green tea on colonic aberrant crypt foci and proliferative indexes in rats. **Nutr. Can.**, v. 39, p. 239-234, 2001.
- JIMÉNEZ-ESCRIG, A., RÍCÓN, M., PULIDO, R., SAURA-CALIXTO, F. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 5489-5493, 2001.
- JOHNSON, F. J., QIN, J., KRINSKY, N. I., RUSSEL, R. M. Ingestion by men of a combined dose of β -carotene and lycopene does not affect the absorption of β -carotene but improves that of lycopene. **J. Nutr.**, v. 127, p. 1833-1837, 1997.
- KASSIE, F., UHL, M., RABOT, S., GRASSI-KRAUPP, B., VERKERK, R., KUNDI, M., CHABICOVSKY, M., SCHULTE-HERMANN, 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.
- KERRY, N., RICE-EVANS, C. A. Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships. **J. Neurochem.**, v. 73, p. 247-261, 1999.
- KIM, C. M., KOIKE, K., SAITO, I., MIYAMURA, T., JAY, G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. **Nature**, v. 351, p. 317-20, 1991.
- KRINSKY, N. I. Overview of lycopene, carotenoids, and disease prevention. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 21, p. 95-97, 1998.
- KULLING, S. E., ROSENBERG, B., JACOBS, E., METZLER, M. The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral lymphocytes. **Arch. Toxicol.**, v. 73, p. 50-54, 1999.
- KWEON, S., KIM, Y., CHOI, H. Grape extracts suppress the formation of preneoplastic foci and activity of fatty acid synthase in rat liver. **Exp. Mol. Med.**, v. 35, p. 371-378, 2003.
- LA VECCHIA, C. Mediterranean epidemiological evidence on tomatoes and prevention of digestive-tract cancers. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 218, p. 125-128, 1998.

- LE, H. T., HANCOCK, J. F., TRINH, T. T. The fruit crop of Vietnam: introduced species and their native relatives. **Fruit Var. J.**, v. 52, p. 158-168, 1998.
- LERAT, H., HONDA, M., BEARD, M. R., LOESCH, K., SUN, J., YANG, Y., OKUDA, M., GOSERT, R., XIAO, S. Y., WEINMAN, S. A., LEMON, S. M. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. **Gastroenterology**, v. 122, p. 352-65, 2002.
- LUXIMON-RAMMA, A., BAHORUN, T., CROZIER, A. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. **J. Sci. Food Agric.**, v. 83, p. 496-502, 2003.
- MACRA, R. *et al.* Carotenoids. In: Encyclopedia of Food Science Food Tech. Nutr. Academic Press, Oxford., v. 1, p. 707-717, 1993
- MAGEE, P.; FARBER, E. Toxic liver injury and carcinogenesis: methylation of rat liver nucleic acids by dimethylnitrosamine *in vivo*. **Biochem. J.**, v. 83, p. 114-24, 1962.
- MAGRATH, I., LITVAK, J. Cancer in developing countries: opportunity and challenge. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 85, p. 862-874.
- MAKIMOTO, K., HIGUCHI, S. Alcohol consumption as a major risk factor for the rise in liver cancer mortality rates in Japanese men. **Int. J. Epidemiol.**, v. 28, p. 30-4, 1999.
- MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C., JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, p. 727-47, 2004.
- MANICA, I, ICUMA, I. M., JUNQUEIRA, N. T. V., SALVADOR, J. O., MOREIRA, A., MALAVOLTA, A. E. Fruticultura tropical: goiaba. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2000.
- MARTINEZ, G. R., LOUREIRO, A. P. M., MARQUES, S. A., MIYAMOTO, S., YAMAGUCHI, L. F., ONUKI, J., ALMEIDA, E. A., GARCIA, C. C. M., BARBOSA, L. F., MEDEIROS, M. H. G., DI MASCIO, P. Oxidative and alkylating damage in DNA. **Mutat. Res.**, v. 544, p. 115-127, 2003.
- MCANLIS, G. T., MCENENY, J., PEARCE, J., YOUNG, I. S. Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions, in man. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 53, p. 92-96, 1993.
- MERCADANTE, A. Z., STECK, A., PFANDER, H. Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): isolation and structure elucidation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 145-151, 1999.
- MIDDLETON, E., KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology; implication for immunity, inflammation and cancer. In: The Flavonoids: Advances in Research since 1986. Ed. By Harborne, J. B. Chapman and London, Hall, p. 619-952, 1994.

- MIEAN, K. H., MOHAMED, S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p.3106-3112, 2001.
- MOLLER, P., LOFT, S., ALFTHAN, G., FREESE, R. Oxidative DNA damage in circulating mononuclear blood cells after ingestion of blackcurrant juice or anthocyanin-rich drink. **Mutat. Res**, v. 551, p.119-126, 2004.
- MOORE, M. A., TSUDA, H., TAMANO, S., HAGIGAWARA, A., IMAIDA, K., HIRAI, T., ITO, N. Marriage of a medium-term liver model to surrogate markers- a practical approach for risks and benefit assessment. **Toxicol. Pathol.**, v. 27, p.237-242, 1999.
- MORI, H., SUGIE, S., YOSHIMI, N., HARA, A., TANAKA, T. Control of cell proliferation in cancer prevention. **Mutat. Res.**, v. 428, p. 291-298, 1999.
- MORIYA, K., FUJIE, H., SHINTANI, Y., YOTSUYANAGI, H., TSUTSUMI, T., ISHIBASHI, K., MATSUURA, Y., KIMURA, S., MIYAMURA, T., KOIKE, K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. **Nat. Med.**, v. 4, p. 1065-7, 1998.
- MORTON, J. F. Fruits of Warm Climates. Julia F. Morton Publishers, Miami, 1987.
- NAKASONE, H. Y., BREKKE, J. E., CAVALETO, C. G. Fruit and yield evaluation of 10 clones of guava (*Psidium guajava* L.). Research Report, **Hawaii Agric. Exp. Station**, v. 218, p. 17, 1976.
- NARISAWA, T., FUKAURA, Y., HASEBE, M., NOMURA, S., OSHIMA, S., SAKAMOTO, H., INAKUMA, T., ISHIGURO, Y., TAKAYASU, J., NISHINO, H. Prevention of N-methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats by lycopene and tomato juice in lycopene. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 89, p.1003-1008, 1998.
- NEMETH, A., NADASI, E., GYONGYI, Z., OLASZ, L., NYARADY, Z., *et al.* Early effects of different cytostatic protocols for head and neck cancer on oncogene activation. **Anticancer Res.**, v. 23, p. 4831-4835, 2003.
- NGUYEN, M. L., SCHWARTZ, S. J. Lycopene: chemical and biological properties. **Food Tech.**, v. 53, p. 38-45, 1999.
- NISHIGUCHI, S., KUROKI, T., NAKATANI, S., MORIMOTO, H., TAKEDA, T., NAKAJIMA, S., SHIMOI, S., SEKI, S., KOBAYASHI, K., OTANI, S. Randomised trial of effects of interferon-alpha on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis. **Lancet**, v. 346, p. 1051-5, 1995.
- NISHINO, H. Cancer prevention by natural carotenoids. **J. Cell Biochem. Suppl.**, v. 27, p.86-91, 1997.
- NURSE, P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. **Cell**, v. 79, p. 547-550, 1994.

- OLAJIDE, A. O., AWE, S. O., MAKINDE, J. M. Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 25-31, 1999.
- O'SHAUGHNESSY, J. A., KELLOFF, G. J., GORDON, G. B., DANNENBERG, A. J., HONG, W. K., FARBIAN, C. J., SIGMAN, C. C., BERTAGNOLLI, M. M., STRATTON, S. P. Treatment and prevention of intraepithelial neoplasia: an important target for accelerated new agent development. **Clin. Cancer Res.**, v.8, p.314-346, 2002.
- PADULA, M., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Characterisation of the carotenoids and assessment of the vitamin A value of Brazilian guavas (*Psidium guajava* L.). **Food Chem.**, v. 20, p. 11-19, 1986.
- PARKER, R. S. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. **FASEB J.**, v. 10, p.542-551, 1996.
- PINES, J. The cell cycle kinases. **Semin. Cancer Biol.**, v. 5, p. 305-313, 1994.
- PINES, S. Cell cycle conformational change. **Nature**, v. 376, p. 294-295, 1995.
- PITOT, H. C., DRAGAN, Y.P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB J.**, v. 5, p.2280-2286, 1991.
- PITOT, H. C.; DRAGAN, Y.P.; TEEGUARDEN, J.; HSIA, S.; CAMPBELL, H. Quantification of multistage carcinogenesis in rat liver. **Toxicol. Pathol.**, v. 24, p.119-28, 1996.
- PITOT, H. C. Pathway of progression in hepatocarcinogenesis. **Lancet**, v. 358, p. 859-860, 2001.
- POOL-ZOBEL, B. L., ADLERCREUTZ, H., GLEIN, M., LIEGIBEL, U. M., STTLINGON, J., ROWLAND, I., WAHALA, K., RECHKEMMER, G. Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 1247-1252, 2000.
- POPPER, H. Introduction: the increasing importance of liver tumors. In: Primary Liver Tumors. Falk Symposium 25. MT Press, Landcaster, p.3-10, 1978.
- QIN, G., NING, Y., LOTLIKAR, P. D. Chemoprevention of aflatoxin b1-initiated and carbon tetrachloride-promoted hepatocarcinogenesis in the rat by green tea. **Nutr. Cancer**, v. 38, p.215-222, 2000.
- QUAGLIA, A., BHATTACHARYA, S., DHILLON, A. P. Limitations of the histopathological diagnosis and prognostic assessment of hepatocellular carcinoma. **Histopathology**, v. 38, p. 167-174, 2001.
- RAO, A. V., WASEEN, Z., AGARWAL, S. Lycopene content of tomatoes and tomato products and their distribution to dietary lycopene. **Food Res. Int.**, v. 10, p. 737-741, 1998.
- RAO, A. V., AGARWAL, S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 19, p.563-569, 2000.

- RAO, A. V., AGARWAL, S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. **Nutrition Res.**, v. 19, p.305, 1999.
- RICE-EVANS, C., MILLER, N. J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 24, p. 790-795, 1996.
- RIJKEN, P., TIMMER, W. G., KOOIJ, A. J., BENSCHOP, I. M., WISEMAN, S. A. . Effect of vegetable and carotenoid consumption on aberrant crypt multiplicity, a surrogate end point marker for colorectal cancer in azoximethane-induced rats. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 2267-2272, 1999.
- RIZZI, M. B.S. L., DAGLI, M. L. Z., JORDÃO, JR., A A; PENTEADO, M. V. C.; MORENO, F. S. β -carotene inhibits persistent and stimulates remodeling γ -GT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. **Int. J. Nutr. Res.**, v. 67, p.415-422, 1997.
- RUSHMORE, T. H., HARRIS, L., NAGAI, M., SHARMA, R. N., HAYES, M. A., CAMERON, R. G., MURRAY, R. K., FABER, E. Purification and characterization of P-52 (glutathione-S-transferase of 7-7) from normal liver and putative preneoplastic liver nodules. **Cancer Res.**, v. 48, p. 2805-12, 1998.
- SAMSON, J. A. Tropical fruits. Tropical Agricultural Series, 2nd ed. Longman, New York, 1986.
- SARRAF, C. E., BOWEN, I. D. Kinetic studies on a murine sarcoma and an analysis of apoptosis. **Br. J. Cancer**, v. 54, p. 989-98, 1986.
- SETIAWAN, S., SULAEMAN, A., GIRAUD, D. W., DRISKEL, J. A. Carotenoid content of selected Indonesian fruits. **J. Food Comp. Anal.**, v. 14, p. 169-176, 2001.
- SHAMSUDIN, R., MOHAMED, I. O., YAMAN, N. K. M. Thermophysical properties of Thai seedless guava juice as affected by temperature and concentration. **J. Food Eng.**, v. 66, p. 395-399, 2005.
- SHERR, C. J., MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell**, v. 2, p. 103-112, 2002.
- SILVA, I., FRANCO, S. L., MOLINARI, S. L., CONEGERO, C. I., MIRANDA NETO, M. H., CARDOSO, M. L. C., SANTANA, D. M. G., IWANKO, N. S. Noções sobre o organismo humano e utilizações de plantas medicinais. Assoeste-Editora Educativa, Cascavel, PR, Brazil, p. 203, 1995.
- SILVEIRA, E. R., NAVES, M. M. V., VANUCCHI, H., JORDÃO, Jr., A. A., DAGLI, M. L. Z.; MORENO, F. S. Vitamin A and all-trans and 9-cis retinoic acids inhibit cell proliferation during the progression phase of hepatocarcinogenesis in Wistar rats. **Nutr. Cancer**, v. 39, p. 244-251, 2001.
- SING, V. N., GABY, S. K. Premalignant lesions: role of antioxidant vitamins and β -carotene in risk reduction and prevention of malignant transformation. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 53, p. 386s-90s. 1991.

- SMUCKLER, E. A. Chemicals, cancer and cancer biology. **West J. Med.**, v. 139, p. 55-74, 1983.
- SOMOGYI, L. P., BARRETT, D. M., HUI, Y. H. Major processed product. US: Technomic Publishing Co. Inc., v. 2, 1996.
- SONG, K., MILNER, J. A. Heating garlic inhibits its ability to suppress 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced DNA adduct formation in rat mammary tissue. **Am. Soc. Nutr. Sci.**, v. 129, p. 657-661, 1999.
- STAHL, W., SIES, H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. **J. Nutr.**, v. 122, p. 2161-2166, 1992.
- STEINMETZ, K. A., POTTER, J.D. Vegetables, fruit and cancer. I. Epidemiology. **Cancer Causes Cont.**, v. 2, p. 325-57, 1991.
- STINCHCOMBE, S., BUCHMANN, A., BOCK, K. W., SCHWARZ, M. Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumor promotion in rat liver. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 1271-1275, 1995.
- SUN, X., SHIMIZO, H., YAMAMOTO, K. I. Identification of a novel p53 promoter element involved in genotoxic stress-inducible p53 gene expression. **Mol. Cell. Biol.**, v. 15, p. 4489-96, 1995.
- SUN, S. Y. Apoptosis induction by chemopreventive agents. **Drug News Persp.**, v. 14, p.75-80, 2001.
- SWENBERG, J. A., DYROFF, M. C., BEDELL, M. A., POPP, J. A., HUH, N., KIRSTEIN, U., RAJEWSKY, M. F. O4-ethyldeoxythymidine, but not O6-ethyldeoxyguanosine, accumulates in hepatocyte DNA of rats exposed continuously to diethylnitrosamine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 1692-1695, 1984.
- TAKEOKA, G. R., DAO, L., FLESSA, S., GILLESPIE, D. M., JEWEL, W. T., HUEBNER, B., BERTOW, D., EBELER, S. Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. **Agric. Food Chem.**, v. 49, p.3713-3717, 2001.
- TAMIMI, R. M., LAGIOU, P., ADAMI, H. O. Prospects for chemoprevention of cancer. **J. Int. Med.**, v. 251, p. 286-300, 2002.
- TANAKA, T. Chemoprevention of human cancer: biology and therapy. **Crit. Rev. Oncol./Hematol.**, v. 25, p. 139-174, 1997.
- TATE, D. Tropical Fruit of Thailand. Asia Books Co. Ltd, Bangkok, Thailand, 2000.
- THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U. Genetic and environmental variance components in guava fruit qualities. **Scient. Horticulturae**, v. 104, p. 37-47, 2005.

- THAM, D. M., GARDNER, C. D., HASKELL, W. L. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, p. 2223-2235, 1998.
- TOLEDO, L. P., ONG, T. P., PINHO, A. G. P., JORDÃO, A. Jr., VANUCCHI, 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. **Nutr. Cancer**, V. 47, p. 62-69, 2003.
- TOMATIS, L. Cell proliferation and carcinogenesis: a brief history and current view based on na IARC workshop report. International Agency for Research on Cancer. **Environ. Health. Perspec.**, v. 101, p. 149-151, 1993.
- UEDA, N., SHAH, S. Apoptosis. **J. Lab. Clin. Med.**, V. 124, p. 169-77, 1994.
- VAN DEN HEUVAL, S., HARLOW, E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. **Science**, v. 262, p. 2050-2054, 1993.
- VENITT, S. Mechanisms of carcinogenesis and individual susceptibility to cancer. **Clin. Chem.**, V. 40, p. 1421-25, 1994.
- VERHOEVEN, D. T., VERHAGEN, H., GOLDBOEHM, R. A., VAN DEN BRANDT, P. A., VAN POPPEL, G. A. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. **Chem. Biol. Interact.**, v. 103, p. 79-129, 1997.
- VERNA, L., WHYSNER, J., WILLIAMS, G. M. N-Nitrodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. **Pharmacol. Ther.**, V. 20, p. 57-81, 1996.
- WALCZAK, H., KRAMMER, P. H. The CD95 (APO-1/Fas) and the trail (APO-2L) apoptosis systems. **Exp. Cell Res.**, v. 256, p. 58-66, 2000.
- WATANABE, S.; KITADE, Y.; MASAKI, T.; NISHIOKA, M.; SATOH, K.; NISHINO, H. Effects of lycopene on Sho-saiko-to on hepatocarcinogenesis in a rat model of spontaneous liver cancer. **Nutr. Cancer**, v. 39, p. 96-101, 2001.
- WATTENBERG, L. W. Inhibitors of chemical carcinogens. **J. Environ. Pathol. Toxicol.**, v. 3, p. 35-52, 1980.
- WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. **Cancer Res.**, v. 45, p. 1-8, 1985.
- WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer by naturally occurring and synthetic compounds. In: WATTENBERG, L. W.; LIPKIN, M.; BOONE, C. W.; KELLOFF, G. J. Cancer chemoprevention. Ann. Arbor., p. 19-39, 1992.
- WATTENBERG, L. W. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. **Cancer Res.**, v. 52, p. 2085s-9s, 1992.
- WATTENBERG, L. W., LIPKIN, M., BOONE, C. W., KELLOFF, G. J. Cancer chemoprevention. **Ann. Arbor.**, p. 1-630, 1992.

- WATTENBERG, L. W. Prevention, therapy and basic science and the resolution of the cancer problem. **Cancer Res.**, v. 53, p.5890-6, 1993.
- WATTENBERG, L. W., COCCIA, J. B., GALBRAITH, A. R. Inhibition of carcinogen-induced pulmonary and mammary carcinogenesis by chalcone administered subsequent to carcinogen exposure. **Cancer Lett.**, v. 83, p. 165-169, 1994.
- WEISBURGER, J. H. Evaluation of the evidence on the role of tomato products in disease prevention. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 218, p. 140-143, 1998.
- WILBERG, V. C., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. HPLC quantitation of major carotenoids of fresh and processed guava, mango and papaya. **Food. Sci. Tech.**, v. 28, p. 474-480, 1995.
- WILSON, C. W. I. Guava. In: NAGY, S., SHAW, P. E. (Eds.). Tropical and Sub-tropical Fruits. Composition, Properties, and Uses. AVI, Westport, CT, p. 279-299, 1980.
- WILSON, V. L., SMITH, R. A., LONGORIA, J., LIOTTA, M. A., HARPER, C. M., HARRIS, C. C. Chemical carcinogen-induced decreases in genomic 5-methyldeoxytydine content of normal human bronchial epithelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 3298-3301, 1987.
- WOOD, G. A., SARMA, D. S., ARCHER, M. C. Resistance to the promotion of glutathione S-transferase 7-7-positive liver lesions in Copenhagen rats. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 1169-1175, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global cancer rates could increase by 50% to 15 million by 2020. **World Health Organization**, Geneva, 2003.
- WU, G. S., BURNS, T. F., MCDONALD, E. R., JIANG, W., MENG, R., KRANTZ, I. D., KAO, G., GAN, D. D., ZHOU, J. Y., MUSCHEL, R., HAMILTON, S. R., SPINNER, N. B., MARKOWITZ, S., WU, G., EL-DEIRY, W. S. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. **Nat. Genet.**, v. 17, p. 141-3, 1997.
- YADAVA, U. I. Guava (*Psidium guajava* L.): an exotic tree fruit with potential in the southeastern United States. **HortScience**, v. 31, p. 789-794, 1996.
- YANG, C. S., LANDAU, J. M., HUANG, M-T, NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Ann. Rev. Nutr.**, v. 21, p. 381-406, 2001.
- YONISH-ROUACH, E., RESNITZKY, D., LOTEM, J., SACHS, L., KIMCHI, A., OREN, M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. **Nature**, v. 352, p. 345-347, 1991.
- ZHAO, Z., KHACHIK, F., RICHIE, J. P., COHEN, L. Lycopene uptake and tissue disposition in male and female rats. **Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 218 p. 109-114, 1998.