

Análise dos efeitos da epigallocatequina-3-galato (EGCG) de *Camellia sinensis* (chá verde) em modelo de hepatotoxicidade química experimental induzida pela Dietilnitrosamina (DEN)

Analysis of the effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) of *Camellia sinensis* (green tea) in experimental chemical model of hepatotoxicity induced by Diethylnitrosamine (DEN)

Vânia Darc de Castro¹; Karina de Almeida Gualtieri²; Alexandre Yukio Saito³; Roberto Iemitsu Tatakihara⁴; Julie Massayo Maeda Oda⁵; Luiz Antonio Custodio⁶; Pedro Sebastião Raimundo Dionizio Filho⁷; Jair Tonon⁸; Thiago Cezar Fujita⁹; Leandra Fiori Lopes¹⁰; Marla Karine Amarante¹¹

Resumo

A Dietilnitrosamina (DEN), uma substância reconhecidamente hepatotóxica e carcinogênica, foi utilizada na indução da necrose hepática centrolobular em ratos isogênicos Lewis divididos em 5 grupos de 5 animais. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito quimiopreventivo da epigallocatequina-3-galato (EGCG), de *Camellia sinensis* (chá verde) no tratamento da hepatotoxicidade celular induzida pela DEN. Foi mensurada a concentração sérica da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) dos diferentes grupos experimentais. No ensaio bioquímico para AST e ALT, houve diferença

¹ Técnica do Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA - LEAP DNA e Nutricionista graduada pelo Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL. E-mail: darc.uel@gmail.com.

² Docente de Patologia, Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL, Londrina, Paraná, Brasil. CEP: 86020-000 – Londrina – Paraná, Brasil. E-mail: kagualtieri@gmail.com.

³ Docente do Depto. Ciências Patológicas, Laboratório de Patologia, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), 86051-970, Londrina, PR, Brasil. E-mail: aysaito@yahoo.com.br.

⁴ Técnico do Hospital Universitário, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil. E-mail: tatakihara1@gmail.com.

⁵ Doutora em Patologia Experimental, Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA - LEAP DNA. Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), 86051-970, Londrina, PR, Brasil. E-mail: julie_massayo@hotmail.com.

⁶ Docente de Parasitologia Clínica, Laboratório de Parasitologia Clínica, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), 86051-970, Londrina, PR, Brasil. E-mail: harpialc@hotmail.com.

⁷ Técnico do Depto. Ciências Patológicas, Laboratório de Patologia, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), 86051-970, Londrina, PR, Brasil. E-mail: dionizio@uel.br.

⁸ Docente do Depto. Ciências Patológicas, Laboratório de Patologia, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), 86051-970, Londrina, PR, Brasil. E-mail: tonon@uel.br.

⁹ Docente de Patologia, Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL, Londrina, Paraná, Brasil. CEP: 86020-000 – Londrina – Paraná, Brasil. E-mail: tefujita@hotmail.com.

¹⁰ Mestre em Patologia Experimental, Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA - LEAP DNA. Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), 86051-970, Londrina, PR, Brasil. E-mail: leandrafioriolopes@gmail.com.

¹¹ Docente do Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas, Laboratório de Hematologia, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), 86051-970, Londrina, PR, Brasil. E-mail: marla_karine@yahoo.com.br.

significativa entre os valores médios do grupo controle ($163\pm 70,32$) comparado ao grupo DEN ($1631\pm 1039,44$), sugerindo que a DEN influencia na função hepática. Entretanto, não houve diferença significativa entre o grupo DEN e o tratado com epigalocatequina. A lactato desidrogenase (LDH) é considerada um marcador bioquímico comum para avaliação da progressão tumoral, e em relação ao LDH, as amostras não apresentaram diferenças significativas entre o grupo DEN ($1385,5\pm 43,13$) e DEN + EGCG 150mg ou DEN + EGCG 200mg ($1537,5\pm 1010,45$). Neste trabalho foi demonstrado que a epigalocatequina nas concentrações de 150 e 200 mg/Kg não induziram alterações hepáticas e também não foi possível verificar nenhuma quimioproteção pela EGCG em animais inicialmente tratados com DEN durante 24 horas. Sendo assim, novos experimentos com diferentes concentrações de EGCG são necessários para comprovar seu possível efeito quimioprotetor.

Palavras chave: Hepatotxicidade. Dietilnitrosamina (DEN). Epigalocatequina-3-galato (EGCG). Lactato desidrogenase (LDH).

Abstract

Diethylnitrosamine (DEN), a known hepatotoxic and carcinogenic substance, was used in the induction of centrilobular hepatic necrosis in isogenic Lewis rats divided into 5 groups with 5 animals. The aim of this study was to evaluate the chemopreventive effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) from *Camellia sinensis* (green tea) in the treatment of cellular hepatotoxicity induced by DEN. It was measured the serum concentration of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) of the different experimental groups. In the biochemistry assay for AST and ALT, there was significant difference between median values of control group (163 ± 70.32) compared to DEN group (1631 ± 1039.44), suggesting that DEN influences on hepatic function. However, there was no significant difference between DEN group to that treated with epigallocatechin. Lactate dehydrogenase (LDH) is considered a common biochemical marker for evaluation of tumor progression, and regarding LDH, the samples presented no significant differences between the DEN group (1385.5 ± 43.13) and DEN + EGCG 150mg or DEN + EGCG 200mg (1537.5 ± 1010.45). In this work it was demonstrated that epigallocatechin concentrations of 150 and 200 mg/kg did not induce liver alterations and though was not verified any chemoprotective effect by EGCG in animals initially treated with DEN for 24 hours. Moreover, new experiments with different concentrations of EGCG are needed to verify its possible chemoprotector effect.

Keywords: Hepatotxicity. Diethylnitrosamine (DEN). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG). Lactate dehydrogenase (LDH).

Introdução

O chá é uma das bebidas mais consumidas no mundo, e o crescente interesse pelo chá verde deve-se principalmente aos estudos que confirmam a alta concentração de flavonóides e a sua relação inversamente proporcional entre o consumo e o risco de doenças degenerativas, como por exemplo, o câncer (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006).

Durante séculos, o chá verde chinês tem sido considerado no Extremo Oriente uma bebida saudável. Depois da água, é a bebida não alcoólica mais consumida no mundo. Nos últimos anos,

alguns estudos produziram resultados que afastaram muitos mitos, mas também confirmaram alguns benefícios importantes para a saúde, em relação ao seu consumo regular. O chá é considerado alimento funcional que se consumido rotineiramente pode trazer benefícios fisiológicos e específicos, graças aos seus componentes ativos (HAN et al., 2004). Este é uma bebida preparada a partir da planta *Camellia sinensis* há aproximadamente 5000 anos (MCKAY; BLUMBERG, 2002). Alterações no processo de fabricação resultam nos derivados: chá preto, chá verde e chá branco, que correspondem a aproximadamente 75%, 23% e 2% da produção global, respectivamente (BLISS, 2003). Para o

preparo, as folhas da planta são cozidas a vapor e secas após seleção para prevenir a oxidação das catequinas (FREI; HIGDON, 2003). O chá verde é rico em vitamina K, nutriente essencial para a coagulação sanguínea. Pelo menos 12 catequinas (compostos polifenólicos) foram identificadas em infusões de chá verde (ZEEB et al., 2000), sendo que os que estão em maiores concentrações são as epicatequinas (EC), epicatequinas galato (ECG), epigalocatequinas (EGC) e epigalocatequinas galato (EGCG). As catequinas são flavonóides responsáveis por controlar e prevenir certas doenças (ZHONG et al., 2004).

Os compostos fenólicos abrangem um grupo de flavonóides que estão presentes em vegetais, frutas, vinho e chá. A capacidade dos polifenóis vegetais em atuar como antioxidantes nos sistemas biológicos já foi reconhecida nos anos trinta (BENTHSATH, 1936), entretanto, este mecanismo antioxidante foi ignorado até pouco tempo. Para alguns derivados de ácidos fenólicos, tem sido relatada a excelente propriedade de quelação do ferro e de outros metais de transição, e neutralização da ação oxidativa dos radicais livres (FIORANI et al., 2002). Estudos realizados demonstraram que os polifenóis presentes no chá verde apresentam bioatividades importantes em certas patologias como: *diabetes mellitus*, cardiopatias, infecções virais, inflamações e em doenças degenerativas, como o câncer e o envelhecimento. Evidências sugerem que a ingestão diária de antioxidantes, principalmente compostos fenólicos, é capaz de retardar o aparecimento destas doenças (HAN et al., 2004).

A identificação de cancerígenos em animais de laboratório, ao lado de estudos epidemiológicos é uma forma importante de avaliar o risco imposto ao homem por agentes químicos (DE CAMARGO et al., 1994; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1987). O esclarecimento deste risco deve levar em consideração o fato de que o desenvolvimento neoplásico é um processo de múltiplas etapas (PITOT, 1993) e que vários fatores podem modificá-las. Dentre estes fatores,

deve ser citado o sistema metabolizador de drogas hepático dependente do citocromo P-450 (CONN et al., 1992; VARELLA, 2005). Esse sistema está situado no retículo endoplasmático liso (REL) de hepatócitos, sendo constituído por duas hemoproteínas (citocromo P-450 e b_5), uma redutase e fosfolípideos, principalmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (GUENGERICH, 1979; OMURA et al., 1984; PARKE, 1987; VARELLA, 2005). A metabolização das substâncias químicas leva à formação de produtos hidrossolúveis, com menor atividade farmacológica ou tóxica, rapidamente excretável pelo rim. No entanto, este processo pode ser responsável pelo aumento da toxicidade de certas drogas e xenobióticos (HIRUMA et al., 2001; YOSHIDA et al., 1999).

Dentre os cancerígenos químicos, encontram-se as nitrosaminas, que dependem de ativação metabólica (formação de radicais livres) para exercerem seus efeitos carcinogênicos e tóxicos. A maior via de ativação das nitrosaminas ocorre por hidroxilação de um carbono-alfa (SAKAI et al., 2000; YOSHIDA et al., 1999).

A dietilnitrosamina (DEN) é uma substância química com peso molecular de 102,1 e estrutura molecular $C_4H_{10}N_2O$ (SAITO et al., 2002). As reações oxidativas de deetilização da DEN conduzem à formação de vários metabólitos, entre os quais se destacam o N-nitrosoetil-N-2-hidroxi-etilamina e N-nitrosoetil-N-carboxi-metil-amina. Estes podem interagir com ácidos nucléicos, produzindo derivados como a 7-etilguanina, 6-etilguanina e a 3-etiladenina, que constituem os substratos bioquímicos da mutação induzida pela DEN (PEGG, 1977; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1978; SWANN; MAGEE, 1971).

A DEN é considerada cancerígena em várias espécies animais, especialmente para o fígado, rim, trato respiratório e digestório alto (YING; SARMA; FARBER, 1980; 1981). Este composto exibe efeito tóxico em nível hepático, onde se manifesta

morfologicamente sob forma de necrose centrolobular, provavelmente pela maior concentração do sistema metabolizador de drogas nesta região (KISHIMA et al., 2000; SCHIMITT et al., 1993).

Tumores hepáticos induzidos quimicamente são precedidos de vários tipos de alterações, que ocorrem em populações celulares focais. Estas alterações, reconhecidas como marcadores fenotípicos são alterações morfológicas ou bioquímicas próprias das células iniciadas, permitindo detectá-las e diferenciá-las das células vizinhas não iniciadas. Evidentemente, estas alterações não são identificadas em tecidos normais e devem aparecer de maneira consistente durante a indução e o estabelecimento do câncer (BANNASCH, 1986; SCHULTE-HERMANN, 1985).

Dentre as alterações celulares persistentes, produzidas por hepatocancerígenos químicos, identificadas por coloração de hematoxilina-eosina (HE) em cortes histopatológicos, destacam-se os focos de células claras (consequentes do acúmulo de glicogênio no citoplasma das células iniciadas), os focos de células eosinofílicas (por hiperplasia do REL), os focos basofílicos (por aumento do número dos ribossomos) e os focos mistos (KISHIMA et al., 2000).

Os fitoterápicos têm sido motivo de intensa investigação científica e sua ação moduladora vem sendo mencionada dentro do contexto de estresse oxidativo, atuando na imunidade inata, principalmente na atividade de macrófagos, como também na imunidade adaptativa estimulando a produção de citocinas. Conhecendo a capacidade dos polifenóis vegetais em atuar nos sistemas biológicos, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da EGCG sobre a necrose hepática induzida pela DEN através de análise histopatológica do fígado e da quantificação das enzimas alanina aminotransferase (ALT/TGP), aspartato aminotransferase (AST/TGO) e lactato desidrogenase (LDH).

Materiais e Métodos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina, CEEA nº 87/08, onde foram utilizados ratos isogênicos Lewis, pesando de 200 a 300g provenientes do Biotério do Hospital Regional Universitário de Londrina.

A ração granulada (marca Nuvital®) e água foram oferecidas “*ad libitum*”. A luminosidade e temperatura foram controladas, utilizando-se fotoperíodo de doze horas (12 horas de luminosidade: 12 horas de escuro), com temperatura constante de 22° C (± 2) e umidade de 55% (± 10).

Conforme o protocolo experimental, após uma semana de adaptação, os animais foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas de polietileno com tampa de aço inox coletivas, forradas com maravalha e divididos em grupos de cinco animais (grupo DEN, EGCG 150mg, EGCG 200mg, DEN+EGCG 150mg, DEN+EGCG 200mg). O grupo controle formado por nove animais não recebeu DEN nem EGCG.

Os animais receberam por via intraperitoneal (i.p.) DEN (200 mg/Kg peso) e após 4 horas foi administrado EGCG (150 mg e 200mg/Kg peso), Sigma-Aldrich (EUA). A dose de 200 mg/Kg de DEN foi adotada de acordo com a média de duração da hepatocarcinogênese química experimental (ITO et al., 1988; 1989). Os animais foram eutanasiados em câmaras de CO₂.

Para avaliar o efeito da DEN e da EGCG sobre os diferentes grupos experimentais foi utilizado a Análise de Variância de ANOVA, e para comparação entre as médias o Teste de Tukey. Foram considerados como estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada através do software de análise gráfica e científica OriginPro 7.5 (OriginLab, Northampton, E.U.A.).

Determinação da hepatotoxicidade da DEN

O plasma foi colhido através de punção cardíaca para dosagem de AST, ALT e LDH. Logo depois, os animais foram eutanasiados, visando à remoção dos órgãos.

Determinação da atividade da Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT)

Os métodos realizados neste trabalho foram adaptações dos procedimentos recomendados pela Federação Internacional de Química Clínica (IFCC). As amostras de sangue foram centrifugadas a 2700rpm por 10 minutos e o plasma foi coletado e armazenado sob-refrigeração por no máximo 24h antes do uso. Todos os métodos foram realizados no auto-analisador Dade XL® (USA), utilizando kits Dade Behring® (Dade Behring, Inc., Newark, NJ) para ALT e AST.

A AST (também conhecida pelas siglas ASAT, GOT, TGO ou SGOT) e a ALT (também conhecida pelas siglas TGP, GPT, ALAT ou SGPT), não são produzidas exclusivamente no fígado e se encontram distribuídas pelo organismo. A AST catalisa a transaminação do L-aspartato para α -cetoglutarato, formando L-glutamato e oxalato. O oxalato formado é reduzido de malato para malato desidrogenase (MDH) com oxidação simultânea da nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzida (NADH). A mudança de absorvância é devido à conversão do NADH em NAD e é diretamente proporcional a atividade da AST, sendo mensurada utilizando uma técnica bicromática (340 e 700nm) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006; STRYER, 1996).

Por sua vez a ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido à lactato por ação da LDH enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD. A redução da absorvância em 340nm, conseqüente à oxidação da NADH, é monitorada fotometricamente sendo diretamente

proporcional à atividade da ALT na amostra. Sua origem é predominantemente citoplasmática, fazendo com que se eleve rapidamente após lesão hepática, tornando-se um marcador sensível da função do fígado (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006; STRYER, 1996).

Determinação Quantitativa de Desidrogenase Láctica (LDH)

Para este ensaio também foi utilizado plasma centrifugado das amostras de sangue. Este método é uma modificação do procedimento enzimático lactato para piruvato. Para a execução da análise de LDH foi utilizado cartucho de reagente Flex® LDH, catálogo DF53A seguindo o manual Dimension®. Foram utilizados 14 μ L da amostra de plasma com 140 μ L de reagente (NAD, tampão Tris, L-lactato) e 196 μ L do diluente. Para realização deste ensaio foi utilizado espectrofotômetro Dimension XL® com comprimento de onda 340nm a 37°C, com tipo de leitura bicromática (unidade de LDH: U/L).

Resultados e Discussão

As aminotransferases (ALT e AST) estão presentes em altas concentrações no músculo, fígado e cérebro. A elevação da atividade das aminotransferases no sangue indica necrose ou moléstia, especialmente nesses tecidos (MURRAY et al., 1994).

A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST está presente na mitocôndria. Essa diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é a citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (MOTTA, 2003).

Neste trabalho foi avaliado o efeito quimioprotetor da EGCG nas doses de 150mg e 200mg, sobre a hepatotoxicidade da DEN (200mg/Kg) no plasma

de ratos sacrificados em 24 horas, após a injeção da DEN e inoculação de EGCG ou ambos.

A análise dos parâmetros bioquímicos que estimam a função hepática como ALT e AST,

foram estatisticamente diferentes entre os grupos DEN e controle sugerindo que a DEN influencia no desenvolvimento de alterações hepáticas (Tabela 1).

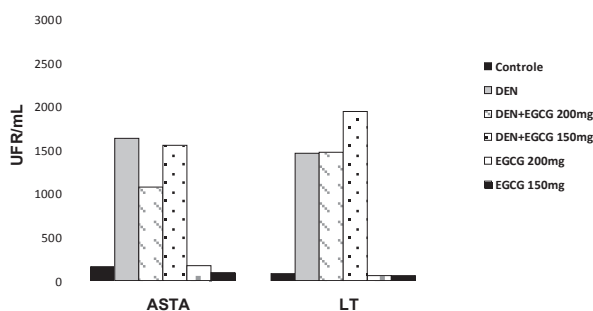
Tabela 1 - Determinação quantitativa das atividades de aspartato amino transferase, alanina amino transferase e desidrogenase láctica (LDH) do plasma dos animais.

MÉTODO	GRUPO CONTROLE	GRUPO DEN	GRUPO DEN + EGCG 200mg	GRUPO DEN + EGCG 150mg	GRUPO EGCG 200mg	GRUPO EGCG 150mg
AST	163±70,32	1631±1039,44	1069,7±733,98	1556,3±613,22	175,33±86,63	96±22,62
ALT	83,33±19,14	1461±175,36	1474,7±1045,38	1938,6±747,68	62±9,654	56,5±3,53
LDH	167,5±38,89	1385,5±43,13	-----	1537,5±1010,45	-----	585,5±514,06

Fonte: Autores.

O gráfico 1 mostra os resultados de determinação bioquímica de AST e ALT de cada grupo, onde foi demonstrado que o grupo EGCG 150mg e 200mg não foram hepatotóxicos em relação ao grupo controle.

Gráfico 1 - Quantificação de aspartato amino transferase e alanina amino transferase do plasma dos animais.



Fonte: Autores.

Os animais experimentais foram tratados com DEN 200mg/Kg i.p. e/ou EGCG nas concentrações de 150 e 200mg/Kg i.p. Os resultados estão

expressos pela média. Os grupos DEN, DEN + EGCG 150mg e DEN + EGCG 200mg, diferem-se significativamente em relação ao grupo controle em nível de $p < 0,05$ (teste de Tukey).

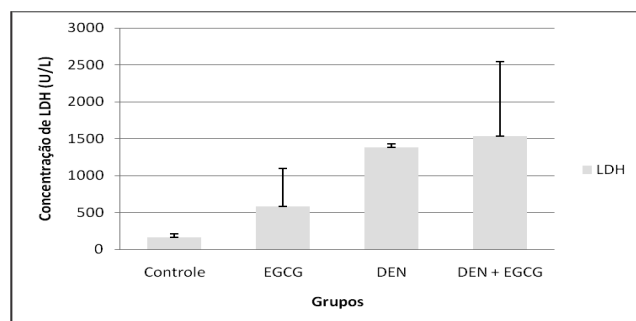
Segundo Lehninger, Nelson e Cox (2006) diversos organismos vivos, como o ser humano, utilizam a via glicolítica para a obtenção de energia. Nessa via, após várias reações catalisadas por enzimas, uma molécula de glicose é degradada dando origem a duas moléculas de piruvato. Durante esse processo, parte da energia livre oriunda da glicose é conservada na forma de ATP e NADH. O piruvato produzido pela via glicolítica pode ter diferentes destinos. Em condições aeróbicas, ele é oxidado ao grupo acetila da acetil-coenzima A, que posteriormente será totalmente oxidada a CO_2 através do ciclo de Krebs. Em processos anaeróbicos o piruvato pode ser convertido em etanol (fermentação alcoólica) ou em lactato (fermentação láctica). A produção de lactato a partir de piruvato envolve a conversão de NADH em NAD^+ e é catalisada pela enzima lactato desidrogenase (LDH).

A LDH é uma enzima constituída de cinco diferentes isoenzimas que catalisam a interconversão

de L-lactato a piruvato. A LDH está presente no citoplasma de todos os tecidos humanos e em altas concentrações no coração e músculo esquelético e em baixas concentrações nos eritrócitos, pâncreas e estômago. A elevação da atividade da LDH é encontrada em várias condições patológicas como o infarto do miocárdio, câncer e doenças do fígado, sangue ou músculos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). Portanto, a próxima etapa deste trabalho foi verificar a concentração de LDH no plasma dos ratos e comparar com os animais saudáveis.

Para a quantificação de LDH foram utilizados amostras de sangue periférico coletadas com anticoagulante heparina e o plasma foi separado para análise. Foi verificado que a concentração de LDH no plasma foi maior nos grupos que receberam DEN, sendo que não houve diferença entre o grupo DEN (1385,5±43,13) e DEN + EGCG 150mg (1537,5±1010,45) como também não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle (167,5±38,89) e EGCG 150mg (585,5±514,06) (Tabela 1). Entretanto foi observada diferença entre os grupos controle e EGCG em relação aos grupos DEN e DEN+EGCG (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Determinação quantitativa da atividade da desidrogenase láctica (LDH).



Fonte: Autores.

Para a quantificação da LDH no plasma sanguíneo, foi utilizado o sistema químico The Dimension® (DADE Behring, Newark, USA).

Os animais experimentais foram tratados com dietilnitrosamina (DEN) 50mg/ml/Kg i.p. e/ou epigalocatequina (EGCG) na concentração de 150mg/Kg i.p. Os resultados estão expressos pela média. Os grupos DEN e DEN + EGCG 150mg, diferem-se significativamente em relação ao grupo controle em nível de $p < 0,05$ (teste de Tukey).

Somente as catequinas (ECG, EGCG) com o grupo galato na posição 3' são os que possuem alta eficácia em inibir a proliferação celular em modelos tumorais *in vitro*. EGCG inibe primariamente a proliferação celular por ativar os sistemas *scavenging* de radicais livres e antioxidantes (HAKIM et al., 2003; KUMARI; YONEDA; HIRAMATSU, 1996; LEANDERSON; FARESJO; TAGESSON, 1997), inibe as enzimas envolvidas na replicação celular e síntese de DNA (AGARWAL et al., 1992; BACHRACH; WANG, 2002; HAN, 1993; KATIYAR; AGARWAL; MUKHTAR, 1992), interfere com a adesão contato célula-célula (GARBISA et al., 1999; KINASHI et al., 1995; LIU et al., 2001; SAZUKA et al., 1997; VAYALIL; KATIYAR, 2004) e inibe algumas vias de comunicação intracelular necessárias para a divisão celular (ISEMURA et al., 2000; JAIN et al., 1989; LIAO; HIIPAKKA, 1995; WANG et al., 1992).

Os efeitos da EGCG e das catequinas do chá verde nas reações biológicas e bioquímicas podem ser classificados em dois grupos: atividades inibitórias e atividades indutivas. Especificamente, as atividades inibitórias foram observadas em reações com: proteína quinase C, peroxidação lipídica, angiogênese, formação de radicais livres, descarboxilase de ornitina, uroquinase, lipoxigenase, cicloxigenase, DNA polimerase, DNA topoisomerase, DNA girase, Bcl-2, ERK1/2 e quinase AKT, ácido graxo sintase, *p*-hidróxibenzoato hidroxilase, epoxidase escaleno, dopa descarboxilase, esteróide 5- α redutase, β -catenina, P-glicoproteína, receptor de fator de crescimento tipo insulina-1, telomerase, proteassomo e vários tipos de proteases (ABE et al., 2000; BERTOLDI; GONSALVI; VOLTATTORNI,

2001; DASHWOOD; ORNER; DASHWOOD, 2002; FUJIKI, 1999; GRADISAR et al., 2007; JODOIN; DEMEULE; BELIVEAU, 2002; LEONE et al., 2003; LIAO et al., 1995; NAM; SMITH; DOU, 2001; SAH et al., 2004; SHIMIZU et al., 2005; TOSETTI et al., 2002; WANG; TIAN, 2001). As atividades indutivas foram encontradas em enzimas de fase II (GST), GSH-Px, catalase, NAD(P)H, quinonaredutase e junção de intervalo (FUJIKI, 1999). O NAD(P)H encontrado confirma a elevação da atividade de LDH o qual pode ser proveniente de lesão no fígado.

Devido sua grande expansão, alta incidência e mortalidade na sociedade moderna, o câncer tornou-se uma preocupação socioeconômica, política e científica, sendo retratado como um problema de saúde pública (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2007). Assim, faz-se necessário mobilizar os esforços na prevenção e cura desta patologia.

Frente ao grande número de novos cânceres, entende-se que técnicas de diagnóstico precoce e prevenção são necessárias (VERGHESE et al., 2002). Nesta busca, incluem-se substâncias quimioprotetoras que não permitam que a doença se instale ou progrida, evitando ao máximo sua toxicidade, razão pela qual têm sido extraídos diferentes extratos de plantas, já descritas como medicinais. O termo quimioprevenção surgiu para descrever uma nova área em Oncologia, que consiste no uso de compostos sintéticos ou naturais para inibir, retardar ou reverter a carcinogênese. A quimioprevenção se baseia na hipótese de que a interrupção dos eventos biológicos envolvidos na carcinogênese inibirá este processo e reduzirá a incidência de câncer (BELTRAN-RAMIREZ et al., 2006).

A hepatotoxicidade associada às drogas e toxinas tem recebido grande atenção nos últimos anos. As lesões hepáticas podem ocorrer por inalação, ingestão ou administração de vários agentes farmacológicos, químicos e também derivados de

plantas e cogumelos (HARRISON; RANDOLPH; FAUCY, 1998).

Acredita-se que, na maioria das vezes em que a agressão hepática ocorre, exista a participação de mais de um mecanismo de lesão hepática (JAESCHKE et al., 2002; LEE, 2003). Um dos principais efeitos observados é o aumento da atividade enzimática sérica, a qual pode estar associada a alterações reversíveis ou irreversíveis da permeabilidade da membrana, indução das enzimas microsômicas ou lesão estrutural resultante de isquemia hepatobiliar, necrose, neoplasia ou colestase (MCNALLY, 1996).

A alanina aminotransferase (ALT/TGP) é uma enzima citosólica considerada hepatoespecífica no cão e gato, embora também possa ser encontrada no coração, rins e músculo. Observa-se que um aumento imediato na atividade sérica desta enzima segue-se a lesão hepatocelular ou a alteração na permeabilidade da membrana celular (ETTINGER; FELDMAN, 1997). Os níveis séricos desta enzima funcionam como um marcador que reflete tanto a necrose hepatocelular como também está relacionada à sua liberação no sangue após o dano na membrana da célula (CHOI et al., 2006; JANBAZ; GILANI, 2000). Neste ensaio não foi verificado aumento nos níveis séricos desta enzima para os grupos EGCG 150mg e 200mg observando-se que não houve lesão ou alteração hepatocelular.

A aspartato aminotransferase (AST/TGO) é uma enzima que está presente em grande concentração em vários tecidos, como coração, fígado, músculo esquelético, rins, cérebro e plasma. O aumento da atividade sérica dessa enzima pode ser resultado de alteração na permeabilidade da membrana, necrose e inflamação. Quando a elevação de AST está relacionada à doença hepática esta é acompanhada de elevação também de ALT. Foi possível verificar uma alteração expressiva desta enzima nos grupos DEN e DEN + EGCG, porém no grupo EGCG o aumento foi baixo, demonstrando que houve uma alteração.

A lactato desidrogenase (LDH), distribui-se amplamente pelos tecidos (ETTINGER; FELDMAN,

1997). Os níveis séricos dessa enzima na circulação funcionam como um marcador de danos hepáticos e são comumente utilizados como marcadores sensíveis para o diagnóstico de doenças hepáticas (CHOI et al., 2006).

O fígado desempenha papel homeostático fundamental no equilíbrio de numerosos processos biológicos (ETTINGER; FELDMAN, 1997). A depuração hepática depende da eficácia das enzimas metabolizadoras (MATOS; MARTINS, 2005). Um dos principais efeitos observados na lesão hepática é o aumento da atividade enzimática sérica (LEWIS et al., 2006).

O efeito hepatoprotetor pode ser verificado em algumas plantas medicinais através dos níveis séricos da AST. As folhas de *Cassia auriculata* demonstraram ter ação hepatoprotetora, por ser capaz de manter os níveis séricos da AST constantes após indução da lesão hepática por etanol (RAJAGOPAL et al., 2003). Outra planta que também apresenta essa característica são as folhas da *Cassia occidentalis* (JAFRI et al., 1999).

No presente trabalho, os níveis de TGO, TGP e LDH foram usados para se determinar o grau de dano hepático induzido pela DEN e também para avaliar os efeitos da EGCG, porém não foi verificado efeito quimioprotetor no tempo experimental de 24h. Os níveis destas enzimas não medem a extensão de danos no fígado em longo prazo, portanto não podem ser usados para se determinar o grau de dano hepático em uma fase crônica, necessitando de estudos sobre os efeitos quimioprotetores da EGCG durante um maior período experimental.

Embora não tenha sido observado efeito tóxico no grupo tratado apenas com EGCG é conhecido que o efeito hepatotóxico da EGCG é dependente da dose, quantidade e tempo de administração. Segundo Lambert et al (2010) foi possível observar necrose em altas concentrações. Esta toxicidade parece estar relacionada com a indução do stress oxidativo no fígado. As doses em que a toxicidade foram observadas são muito mais elevadas do que aquelas

normalmente consumidas de chá verde. Mais estudos sobre os mecanismos de hepatotoxicidade da EGCG e monitorização cuidadosa dos biomarcadores de toxicidade devem ser realizados.

Ainda que, nossos resultados não demonstraram uma quimioproteção pela epigalocatequina-3-galato contra as lesões hepáticas induzida pela DEN é indiscutível a quantidade de trabalhos na literatura sobre os benefícios do consumo regular e moderado do chá verde e seus compostos, principalmente como antioxidantes. Por isso, fazem-se necessários novos experimentos com diferentes concentrações de EGCG e em fases crônicas e sub-crônicas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária-Programa Pesquisa no SUS: Gestão Compartilhada em Saúde (PPSUS) e Coordenação de Pós-Graduação da Universidade (UEL-PROPPG). Universidade Estadual de Londrina.

Referências

- ABE, I.; SEKI, T.; UMEHARA, K.; MIYASE, T.; NOGUCHI, H.; SAKAKIBARA, J.; ONO, T. Green tea polyphenols: novel and potent inhibitors of squalene epoxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, New York, v. 268, n. 3, p. 767–771, 2000.
- AGARWAL, R.; KATIYAR, S. K.; ZAIDI, S. I.; MUKHTAR, H. Inhibition of skin tumor promoter-caused induction of epidermal ornithine decarboxylase in SENCAR mice by polyphenolic fraction isolated from green tea and its individual epicatechin derivatives. *Cancer Research*, Chicago, v. 52, n. 13, p. 3582–3588, 1992.
- BANNASCH, P. Preneoplastic lesion as end-point in carcinogenicity testing. I. Hepatic preneoplasia. *Carcinogenesis*, Oxford, v. 7, n. 5, p. 689-695, 1986.

- BELTRÁN-RAMÍREZ, O.; MARTÍNEZ, J. H.; SANTOYO, A. S.; TREVIÑO, S. V. Mecanismo de Quimioprevención del Ester Fenético del Ácido Caféico (Cape) en la iniciación de un Modelo de Hepatocarcinogénesis: Alteración de los Cyp450. In: CONGRESSO NACIONAL DE QUÍMICA MEDICA, 2., 2006. *Anales*.
- BENTHATH, A.; RUSZNYAK, S.; SZENT-GYÖRGY, A. Vitamin nature of flavone. In: RICE-EVANS, C. A.; PACKER, L. (Ed.). *Flavonoids in health and disease*. New York: Marcel Dekker, 1936. p. 137-161.
- BERTOLDI, M.; GONSALVI, M.; VOLTATTORNI, C. B. Green tea polyphenols: novel irreversible inhibitors of dopa decarboxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, New York, v. 284, n. 1, p. 90–93, 2001.
- BLISS, R. M. Brewing up the latest tea research. *Agricultural Research Service*, Washington, v. 51, p. 10-13, 2003.
- BACHRACH, U.; WANG, Y. C. Cancer therapy and prevention by green tea: role of ornithine decarboxylase. *Amino Acids* 22:1– 13, 2002.
- CHOI, J. S.; YOON, T. J.; KANG, K. R.; LEE, K. H.; KIM, W. H.; SUH, Y. H.; SONG, J.; JUNG, M. H. Glycoprotein Isolated from *Acanthopanax senticosus* Protects against Hepatotoxicity Induced by Acute and Chronic Alcohol Treatment. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v. 29, n. 2, p. 306-314, 2006.
- CONN, M. J.; DING, X.; PERNECKY, S. J.; VAZ, A. D. N. Cytochrome P-450: progress and predictions. *FASEB journal*, Bethesda, v. 6, n. 2, p. 669-673, 1992.
- DASHWOOD, W. M.; ORNER, G. A.; DASHWOOD, R. H. Inhibition of beta-catenin/Tcf activity by white tea, green tea, and epigallocatechin-3-gallate (EGCG): minor contribution of H₂O₂ at physiologically relevant EGCG concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, New York, v. 296, n. 3, p. 584–588, 2002.
- DE CAMARGO, J. L. V.; OLIVEIRA, M. L. C. S.; ROCHA, N. S.; ITO, N. A. A detecção de substâncias cancerígenas em estudos experimentais. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 21-30, 1994.
- ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Tratado de medicina interna veterinária: moléstia do cão e do gato*. 40 ed. São Paulo: Manole, 1997. v. 2.
- FIORANI, M.; SANCTIS, R.; BELLIS, R.; DACHÀ, M. Intracellular flavonoids as electron donors for extra-cellular ferricyanide reduction in human erythrocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, New York, v. 32, n. 1, p. 64-72, 2002.
- FREI, B.; HIGDON, J. V. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *Journal of Nutrition*, Springfield, v. 133, n. 10, p. 3275S-3284S, 2003.
- FUJIKI, H. Two stages of cancer prevention with green tea. *Journal of Cancer research and Clinical Oncology*, Berlin, v. 125, n. 11, p. 589–597, 1999.
- GARBISA, S.; BIGGIN, S.; CAVALLARIN, N.; SARTOR, L.; BENELLI, R.; ALBINI, A. Tumor invasion: molecular shears blunted by green tea. *Nature Medicine*, New York, v. 5, n. 11, p. 1216, 1999.
- GRADISAR, H.; PRISTOVSEK, P.; PLAPER, A.; JERALA, R. Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, n. 2, p. 264–271, 2007.
- GUENGERICH, F. P. Isolation and purification of cytochrome P-450 and the existence of multiple forms. *Pharmacology & Therapeutics*, Oxford, v. 6, n. 1, p. 99-121, 1979.
- HAKIM, I. A.; HARRIS, R. B.; BROWN, S.; CHOW, H. H.; WISEMAN, S.; AGARWAL, S.; TALBOT, W. Effect of increased tea consumption on oxidative DNA damage among smokers: a randomized controlled study. *Journal of Nutrition*, Springfield, v. 133, n. 10, p. 3303S–3309S, 2003.

- HAN, D. W.; PARK, Y. H.; KIM, J. K.; LEE, K. Y.; HYON, S. H.; SUH, H.; PARK, J. C. Effects of green tea polyphenol on preservation of human saphenous vein. *Journal of Biotechnology*, v. 110, n. 2, p. 109-117, 2004.
- HAN, J. Highlights of the cancer chemoprevention studies in China. *Preventive Medicine*, New York, v. 22, n. 5, p. 712-722, 1993.
- HARRINSON, T. R.; RANDOLPH, T.; FAUCY, A. S. *Hepatite tóxica e induzida por fármacos: medicina Interna*. 14. ed. Rio de Janeiro: MC Graw Hill, 1998.
- HIRUMA, S.; GOPALAN-KRICZKY, P.; QIN, G.; GAUHAN, J. P.; LOTLIKAR, P. D. Differential effects of acetaminophen pretreatment on hepatic aflatoxin B1-DNA binding, cellular proliferation and aflatoxin B1-induced hepatic foci in rats and hamsters. *Cancer Letters*, Amsterdam, v. 170, n. 2, p. 117-124, 2001.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=469>. Acesso em: 15 fev. 2007.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. Some N-nitroso compounds. *IARC Monographs*, v. 17, p. 1-365, 1978.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Overall evaluations of carcinogenicity. *IARC Monographs*, s. 7, p. 440, 1987.
- INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY. Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. *Clinica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 70, n. 2, p. f19-f42, 1976.
- ISEMURA, M.; SAEKI, K.; KIMURA, T.; HAYAKAWA, S.; MINAMI, T.; SAZUKA, M. Tea catechins and related polyphenols as anti-cancer agents. *BioFactors*, Oxford, v. 13, n. 1/4, p. 81-85, 2000.
- ITO, N.; IMAIDA, K.; HASEGAWA, R.; TSUDA, H. Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. *Critical Reviews in Toxicology*, Boca Raton, v. 19, n. 4, p. 385-415, 1989.
- 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*, New York, v. 9, n. 3, p. 387-394, 1988.
- JAESCHKE, H.; GORES, G. J.; CEDEBAUM, A. I.; HINSON, J. A.; PESSAYRE, D.; LEMASTERS, J. J. Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, Orlando, v. 65, n. 2, p. 166-176, 2002.
- JAFRI, M. A.; JALIS SUBHANJ, M.; JAVED, K.; SINGH, S. Hepatoprotective activity of leaves of *Cassia occidentalis* against paracetamol and ethyl alcohol intoxication in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 66, n. 3, p. 355-361, 1999.
- JAIN, A. K.; SHIMOI, K.; NAKAMURA, Y.; KADA, T.; HARA, Y.; TOMITA, I. Crude tea extracts decrease the mutagenic activity of N-methyl-NV-nitro-Nnitrosoguanidine in vitro and in intragastric tract of rats. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 210, n. 1, p. 1-8, 1989.
- JANBAZ, K. H.; GILANI, A. H. Studies on preventive and curative effects of berberine on chemical- induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*, Milano, v. 71, n. 1, p. 25-33, 2000.
- JODOIN, J.; DEMEULE, M.; BELIVEAU, R. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1542, n. 1/3, p. 149-159, 2002.

- KATIYAR, S. K.; AGARWAL, R.; MUKHTAR, H. Green tea in chemoprevention of cancer. *Comprehensive Therapy*, Skokie, v. 18, p. 3–8, 1992.
- KINASHI, T.; ESCOBEDO, J. A.; WILLIAMS, L. T.; TAKATSU, K.; SPRINGER, T. A. Receptor tyrosine kinase stimulates cell-matrix adhesion by phosphatidylinositol 3 kinase and phospholipase C-gamma 1 pathways. *Blood*, New York, v. 86, n. 6, p. 2086–2090, 1995.
- KISHIMA, M. O.; BARBISAN, L. F.; ESTEVÃO, D.; RODRIGUES, M. A. M.; DE CAMARGO, J. L. V. Promotion of hepatocarcinogenesis by hexachlorobenzene in energy-restricted rats. *Cancer Letters*, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 37-44, 2000.
- KUMARI, M. V.; YONEDA, T.; HIRAMATSU, M. Scavenging activity of beta catechin Q on reactive oxygen species generated by photosensitization of riboflavin. *Biochemistry and Molecular Biology International*, Sydney, v. 38, n. 6, p. 1163–1170, 1996.
- LAMBERT, J. D.; KENNETT, M. J.; SANG, S.; REUHL, K. R.; JU, J.; YANG, C. S. Hepatotoxicity of high oral dose (–)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v. 48, n. 1, p. 409-416, 2010.
- LEANDERSON, P.; FARESJO, A. O.; TAGESSON, C. Green tea polyphenols inhibit oxidant-induced DNA strand breakage in cultured lung cells. *Free radical biology & medicine*, New York, v. 23, n. 2, p. 235–242, 1997.
- LEE, W. M. Drug- induced hepatotoxicity. *The New England Journal of Medicine*, Boston, v. 349, p. 474-485, 2003.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger princípios de bioquímica*. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.
- LEONE, M.; ZHAI, D.; SARETH, S.; KITADA, S.; REED, J. C.; PELLECCIA, M. Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cancer Research*, Chicago, v. 63, p. 8118–8121, 2003.
- LEWIS, J. H.; AHMED, M.; SHOBASSY, A.; PALESE, A. C. Drug-induced liver disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, New York, v. 22, p. 223–233, 2006.
- LIAO, S.; HIIPAKKA, R. A. Selective inhibition of steroid 5 alpha-reductase isozymes by tea epicatechin-3-gallate and epigallocatechin-3-gallate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Orlando, v. 214, p. 833–838, 1995.
- LIAO, S.; UMEKITA, Y.; GUO, J.; KOKONTIS, J. M.; HIIPAKKA, R. A. Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechin gallate. *Cancer Letters*, Amsterdam, v. 96, p. 239–243, 1995.
- LIU, J. D.; CHEN, S. H.; LIN, C. L.; TSAI, S. H.; LIANG, Y. C. Inhibition of melanoma growth and metastasis by combination with (–)-epigallocatechin- 3-gallate and dacarbazine in mice. *Journal of Cellular Biochemistry*, New York, v. 83, p. 631–642, 2001.
- MATOS, L. C.; MARTINS, B. Toxic hepatitis: literature review. *Medicina Interna*, Bucuresti, v. 12, n. 4, 2005.
- MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de catequinas e teafloavinas em chás comercializados no Brasil. *Food Science and Technology*, Campinas, v. 26, n. 2, p. 401-407, abr./ jun. 2006.
- MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. The role of tea in human health: an update. *Journal of the American College of Nutrition*, New York, v. 21, p. 1-13, 2002.
- MCNALLY, P. R. Drug-Induced Liver Disease. In: _____. *GI/Liver Secrets*. London: Elsevier, 1996. p. 174-175
- MOTTA, V. T. *Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações*. 4. ed. São Paulo: Robe, 2003.

- MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. *Harper: bioquímica*. 7. ed. São Paulo: Atheneu, 1994.
- NAM, S.; SMITH, D. M.; DOU, Q. P. Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 276, p. 13322-13330, 2001.
- OMURA, T.; SADANO, H.; HASEGAWA, T.; YOSHIDA, Y.; KOMINAMI, S. Hemoprotein H-450 identified as a form of cytochrome P-450 having an endogenous ligand at the 6th coordination position of the heme. *Journal of Biochemistry*, Tokyo, v. 96, p. 1491-1500, 1984.
- PARKE, D. V. Activation mechanisms to chemical toxicity. *Archives of Toxicology*, New York, v. 60, p. 5-15, 1987.
- PEGG, A. E. Formation and metabolism of alkylated nucleosides: possible role in carcinogenesis by nitroso compounds and alkylating agents. *Advances in Cancer Research*, New York, v. 25, p. 195-269, 1977.
- PITOT, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*, New York, v. 72n. 3, p. 762-770, 1993.
- RAJAGOPAL, S. K.; MANICKAM, P.; PERIYASAMY, V.; NAMASIVAYAM, N. Activity of *Cassia auriculata* leaf extract in rats with alcoholic liver injury. *Journal of Nutritional Biochemistry*, Stoneham, v. 14, p. 452-458, 2003.
- SAH, J. F.; BALASUBRAMANIAN, S.; ECKERT, R. L.; RORKE, E. A. Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway. Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 279, p. 12755-12762, 2004.
- SAITO, A. Y.; CORRÊA, P. R. C.; DIONÍZIO FILHO, P. S. R.; VARGAS, J. A.; CECCHINI, R.; TONON, J.; ESTEVÃO, D. Inibição da cito toxicidade da dietilnitrosamina pelo dietilditiocarbamato e sulfeto dialílico. *Biosaúde*, Londrina, v. 4, n. 2, p. 81-98, jul./dez. 2002.
- SAKAI, H.; TSUKAMOTO, T.; YAMAMOTO, M.; YANAI, T.; MASEGI, T.; INADA, K.; NAKANISHI, H.; TATEMATSU, M. Summation of initiation activities of low doses of the non-hepatocarcinogen 1,2 dimethylhydrazine in the liver after carbon tetrachloride administration. *Cancer Letters*, Amsterdam, v. 148, p. 59-63, 2000.
- SAZUKA, M.; IMAZAWA, H.; SHOJI, Y.; MITA, T.; HARA, Y.; ISEMURA, M. Inhibition of collagenases from mouse lung carcinoma cells by green tea catechins and black tea theaflavins. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Tokyo, v. 61, p. 1504-1506, 1997.
- SCHMITT, F. C. L.; ESTEVÃO, D.; KOBAYASI, S.; CURI, P.; DE CAMARGO, J. L. V. Altered foci of hepatocytes in rats initiated with diethylnitrosamine after prolonged fasting. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v. 31, n. 9, p. 629-636, 1993.
- SCHULTE-HERMANN, R. Tumor promotion in the liver. *Archives of Toxicology*, New York, v. 57, p. 147-58, 1985.
- SHIMIZU, M.; DEGUCHI, A.; HARA, Y.; MORIWAKI, H.; WEINSTEIN, I. B. EGCG inhibits activation of the insulin-like growth factor-1 receptor in human colon cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, New York, v. 334, n. 3, p. 947-953, 2005.
- STRYER, L. *Bioquímica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- SWANN, P. F.; MAGEE, P. N. Nitrosamine-induced carcinogenesis: the alkylation of N-7 of guanine of nucleic acids of the rat by diethylnitrosamine, N-ethyl-N-nitrosourea and ethyl methanesulfonate. *Biochemical Journal*, London, v. 125, n. 3, p. 841-847, 1971.
- TOSETTI, F.; FERRARI, N.; DE FLORA, S.; ALBINI, A. Angioprevention: angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents. *FASEB Journal*, Bethesda, v. 16, n. 1, p. 2-14, 2002.

- VARELLA, S. D. *Análise da mutagenicidade urinária e susceptibilidade genética no monitoramento de indivíduos expostos a solventes orgânicos*. 2005. 98 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2005.
- VAYALIL, P. K.; KATIYAR, S. K. Treatment of epigallocatechin-3-gallate inhibits matrix metalloproteinases-2 and -9 via inhibition of activation of mitogen-activated protein kinases, c-jun and NF-kappaB in human prostate carcinoma DU-145 cells. *Prostate*, New York, v. 59, p. 33–42, 2004.
- VERGHESE, M.; RAO, D. R.; CHAWAN, L. L.; SHACKELFORD, L.; SHACKELFORD, W. Dietary inulin suppresses azoxymethane-induced preneoplastic aberrant crypt foci mature fisher 344 rats. *Journal of Nutrition*, Springfield, v. 132, p. 2804-2808, 2002.
- WANG, X.; TIAN, W. Green tea epigallocatechin gallate: a natural inhibitor of fatty-acid synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, New York, v. 288, n. 5, p. 1200–1206, 2001.
- WANG, Z. Y.; HUANG, M. T.; HO, C. T.; CHANG, R.; MA, W.; FERRARO, T.; REUHL, K. R.; YANG, C. S.; CONNEY, A. H. Inhibitory effect of green tea on the growth of established skin papillomas in mice. *Cancer Research*, Chicago, v. 52, n. 23, p. 6657–6665, 1992.
- YING, T. S.; SARMA, D. S. R.; FARBER, E. Role of acute hepatic necrosis in the induction of early steps in liver carcinogenesis by diethylnitrosamine. *Cancer Research*, Chicago, v. 41, n. 6, p. 2096-2102, 1981.
- YING, T. S.; SARMA, D. S. R.; FARBER, E. The sequential analysis of liver cell necrosis; inhibition of diethylnitrosamine and dimethylnitrosamine induce acute liver cell death by post-treatment with diethyldithiocarbamate. *American Journal of Pathology*, Philadelphia, v. 99, n. 1, p. 159-174, 1980.
- YOSHIDA, M.; MIYAJIMA, K.; SHIRAKI, K.; ANDO, J.; KUDOH, K.; NAKAE, D.; TAKAHASHI, M.; MAEKAWA, A. Hepatotoxicity and consequently increased cell proliferation are associated with flumequine hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Letters*, Amsterdam, v. 141, n. 1/2, p. 99-107, 1999.
- ZEEB, D. J.; NELSON, B. C.; ALBERT, K.; DALLUGE, J. J. Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatographic/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 72, n. 20, p. 5020–5026, 2000.
- ZHONG, Z.; CONNOR, H. D.; FROH, M.; LIND, H.; BUNZENDAHL, H.; MASON, R. T.; THURMAN, R. G.; LENASTRS, J. J. Polyphenols from *Camellia sinensis* prevent primary graft failure after trans-plantation of ethanol-induced fatty livers from rats. *Free Radical Biology & Medicine*, New York, v. 36, n. 10, p. 1248-1258, 2004.

Recebido em: 30 de julho de 2010
Aceito em: 07 de julho de 2013