

CAFÉ MODULA A HEPATOCARCINOGENESE QUÍMICA EM RATOS

Eliane Moreto Silva-Oliveira²; Paula Ávila Fernandes³; Tasso Moraes-Santos⁴

¹Trabalho apoiado financeiramente pela Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e Fapemig (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais).

²Doutoranda, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia - UFMG, elianesilv@gmail.com

³Pesquisadora, D.Sc, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia - UFMG, pavilafernandes@gmail.com

⁴Pesquisador, PhD, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia - UFMG, tmoraes@ufmg.br

RESUMO: O objetivo do estudo foi investigar o efeito da ingestão diária de café sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas hepáticas em ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese hepatócito resistente (HR). Ratos Wistar prenhas foram selecionadas e divididas, após o nascimento dos filhotes, em dois grupos: um grupo foi alimentado com ração controle, enquanto o outro foi alimentado com ração adicionada com 1,5% de extrato de café liofilizado. Após o desmame, os filhotes machos receberam o mesmo protocolo alimentar e foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese HR. Os animais foram sacrificados no 110º dia de vida e análises morfométricas de lesões hepáticas foram conduzidas em cortes histológicos submetidos à técnica histoquímica para glicose 6-fosfatase. Os animais alimentados com ração adicionada de café apresentaram redução de 78% no número total de lesões pré-neoplásicas e de 86,8% na área hepática ocupada pelas lesões persistentes. O menor número de lesões pré-neoplásicas e a redução da área ocupada pelas lesões persistentes indicam que o café modula a hepatocarcinogênese química em ratos.

Palavras-chave: Café, hepatocarcinogênese química, modelo hepatócito resistente, ratos Wistar.

COFFEE MODULATES THE CHEMICAL HEPATOCARCINOGENESIS IN RATS

ABSTRACT: The aim of the study was to investigate the effect of daily coffee ingestion on the development of hepatic preneoplastic lesions in rats submitted to the resistant hepatocyte (RH) model of hepatocarcinogenesis. Pregnant female Wistar rats were selected and divided, after delivery, into two groups: a group was fed a control diet, while another was fed a diet supplemented with a 1.5% lyophilized coffee extract. After weaning, male pups followed the same dietary protocol and were submitted to the RH model of hepatocarcinogenesis. The animals were sacrificed at 110 days of life and morphometric analyses of lesions were carried out on histological sections of the liver submitted to the histochemical technique to glucose-6-phosphatase. The animals fed the diet supplemented with coffee presented a 78.0% reduction in the total number of preneoplastic lesions and 86.8% in the hepatic area occupied by persistent lesions. The lower number of preneoplastic lesions and reduced areas occupied by the persistent lesions indicate that coffee modulates chemical hepatocarcinogenesis in rats.

Key words: Coffee; chemical hepatocarcinogenesis; resistant hepatocyte model; Wistar rats.

INTRODUÇÃO

Na hepatocarcinogênese experimental, focos de hepatócitos alterados aparecem durante ou imediatamente após a iniciação com diferentes carcinógenos (Kitagawa & Pitot, 1975; Tsuda et al., 1980). Após a exposição a carcinógenos ou a outro ambiente promotor de tumor, estes focos crescem para se tornar nódulos macroscopicamente visíveis (Ogawa et al., 1980; Tatematsu et al., 1983). Os focos de hepatócitos alterados e nódulos hepáticos hiperplásicos, decorrentes da expansão clonal de hepatócitos iniciados, precedem o aparecimento do tumor e são denominados como lesões pré-neoplásicas (LPN) (Farber, 1984). Uma característica da hepatocarcinogênese experimental é que a maioria dos focos e nódulos fenotipicamente alterados (93% a 98%) sofrem remodelação para uma aparência de fígado normal, enquanto um pequeno subgrupo destas LPN persiste e prolifera, podendo progredir para carcinoma hepatocelular (Tatematsu et al., 1983; Farber & Rubin, 1991).

O café é uma bebida de grande popularidade e consumida mundialmente, havendo diferentes estudos concernentes aos efeitos da bebida e de seus constituintes sobre a saúde. Diferentes constituintes do café como cafeína (Devasagayam et al., 1996), ácidos clorogênicos (Shimizu et al., 1999) e diterpenos (Cavin et al., 2002) têm sido sugeridos como potencialmente quimioprotetores num largo espectro de sistemas. Além dos estudos com os constituintes do café, diversos estudos epidemiológicos mostram relação inversa entre o consumo de café e o risco de

câncer em diferentes órgãos como pulmão (Mendilaharsu et al., 1998), mama (Kermode-Scott, 2006), faringe, esôfago (Tavani et al., 2003) e fígado (Gelatti et al., 2005; Ohfuji et al., 2006).

Apesar dos estudos que demonstram atividade quimioprotetora dos constituintes do café e das evidências epidemiológicas, poucos modelos de câncer experimental têm sido usados para investigar o papel quimioprotetor da bebida *in vivo*. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do café sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas hepáticas em ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese hepatócito resistente (HR).

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Foram utilizados no experimento ratos da raça Wistar da colônia do Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Ratas prenhas foram selecionadas e, logo após o parto, as fêmeas, com os respectivos filhotes, foram aleatoriamente separadas em dois grupos. Um grupo foi formado por cinco fêmeas que receberam ração controle ao longo do período de lactação, enquanto o segundo grupo foi formado por cinco fêmeas que receberam ração adicionada de extrato de café liofilizado a 1,5%.

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

No 42º dia de vida, os animais do Grupo Controle e Grupo Café foram subdivididos: a metade dos animais de cada grupo foi submetida somente à hepatectomia parcial, enquanto a outra metade dos dois grupos foi submetida ao modelo de hepatocarcinogênese HR. A indução da hepatocarcinogênese foi realizada por adaptação do modelo descrito por Solt & Farber (1976). A iniciação ocorreu no 42º dia de vida dos animais por injeção intraperitoneal de dose única de Dietilnitrosamina 200 mg/Kg de peso corporal. Dezesete dias após a iniciação, os animais receberam durante quatro dias consecutivos, via gavagem, 2-Acetilaminofluoreno (2-AAF), na dosagem de 20 mg/Kg de peso corporal. No quinto dia foi realizada HP de dois-terços do órgão (Higgins & Anderson, 1931). Dois e quatro dias depois da realização da hepatectomia, uma dose adicional de 20 mg/Kg de peso corporal de 2-AAF foi novamente administrada. Todos os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina com aproximadamente 110 dias de vida.

Após o sacrifício dos animais, os fígados foram removidos, secados em papel filtro e pesados. Um fragmento representativo do lobo lateral direito de cada animal, após um período de três horas mantidos a 4°C em solução de sacarose 30% em tampão fosfato 0,1 M, foi congelado em criostato a -18°C, onde confeccionaram-se cortes histológicos de 10 µm de espessura. Três lâminas com cortes seqüenciais foram preparadas para cada animal. Uma lâmina foi corada pela hematoxilina e eosina e a subsequente foi submetida à reação de histoquímica para a glicose 6-fosfatase (G6Pase), de acordo com a metodologia de Wachstein & Meisel (1956). A última lâmina foi mantida a -80°C para eventual utilização.

Caracterização do café e preparo das rações

Foi utilizado café da espécie *Coffea arabica*, torrado e moído, adquirido de estabelecimento de torrefação do Sul de Minas. A amostra utilizada foi do tipo exportação, grão sem defeito, granulação média e de processo de preparo natural de bebida mole. Segundo informações do fornecedor, os grãos foram torrados a uma temperatura de 160°C por aproximadamente 13 minutos, com classificação 45 ideal para consumo. A classificação dos pontos de torra foi realizada com auxílio de discos colorimétricos AGTRON/SCAA, de acordo com os padrões utilizados pela Associação Brasileira da Indústria de Café. O café, torrado e moído, foi extraído em água destilada (6% p/v) a 90°C. Após agitação por dois minutos, a suspensão foi colocada em banho à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 27 x g por 10 min a 8°C e o sobrenadante liofilizado. O extrato de café liofilizado foi armazenado a -20 °C até o momento do preparo da ração café.

No preparo da ração controle, para cada 90 g de ração comercial para biotério moída, foram adicionados 100 mL de uma solução contendo 4% de gelatina em pó, 1% de amido de milho e 5% de açúcar refinado, previamente dissolvidos a quente. Depois de homogeneizada, a massa resultante foi cortada e secada a 60°C em estufa com circulação forçada de ar. A ração café teve por base a ração controle adicionada de café liofilizado a 1,5%.

Análise histológica

As imagens dos cortes histológicos contendo as LPN foram capturadas, sendo as LPN contadas e classificadas como persistentes ou de remodelação de acordo com o padrão de coloração para a G6Pase (Ogawa et al., 1980). Foram classificadas como persistentes as lesões marcadamente delimitadas do parênquima ao redor, apresentando coloração negativa uniforme para G6Pase. Lesões de remodelação foram consideradas aquelas que não apresentaram coloração negativa não uniforme dos hepatócitos, exibindo delimitação irregular em relação ao parênquima circunjacente.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Filliben seguido de análise de variância e comparação de médias pelo teste de Duncan ou Mann & Whitney. Estabeleceram-se como significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da ingestão diária de café sobre e o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas hepáticas em ratos submetidos ao modelo HR. A ingestão de café e a indução da carcinogênese não alteraram o peso corporal na data do sacrifício, o ganho de peso corporal após a HP, bem como o peso do fígado (Tabela 1). O café adicionado à ração não alterou o consumo de dietas pelos animais (dados não apresentados). Estes resultados sugerem ausência de toxicidade proveniente da ingestão diária de café na concentração usada no estudo. Assim, o efeito observado do café parece ser específico sobre a carcinogênese.

Contrário ao que foi observado nos animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese, na análise macro e microscópica do fígado dos animais submetidos somente à HP não foram observadas LPN. Os animais que receberam café diariamente na ração apresentaram redução significativa em todos os parâmetros morfométricos analisados. Houve redução de 78% no número total de LPN, 85,5% no número de nódulos persistentes, 70,5% no número de nódulos de remodelação e 86,8% na área total ocupada pelas LPN (tabela 2). Estes resultados estão de acordo com Tanaka et al. (1990), cujo estudo mostrou proteção contra o desenvolvimento de tumores hepáticos pelo café. Em adição, nossos resultados suportam recentes estudos epidemiológicos que mostram relação inversa entre o consumo de café e o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Inoue et al., 2005; Ohfuji et al., 2006; Tanaka et al., 2007).

Tabela 1 - Peso corporal, ganho de peso corporal pós-hepatectomia e peso do fígado¹.

Grupos	CO (10) ²	Café (10)	CO CA (9)	Café CA (8)
Peso corporal no sacrifício	426,64 ± 10,20	412,98 ± 14,53	403,56 ± 12,31	402,13 ± 12,27
Ganho de peso corporal ³	126,86 ± 6,73	136,77 ± 11,19	127,60 ± 12,59	141,56 ± 10,74
Peso do fígado na data da HP	11,56 ± 0,38	10,93 ± 0,38	10,70 ± 0,41	10,64 ± 0,36
Peso do fígado regenerado	12,50 ± 0,60	13,29 ± 0,41	13,36 ± 1,31	12,49 ± 0,48

¹ Resultados expressos como média ± erro padrão da média. ² Número de animais por grupo apresentado entre parênteses. ³ Ganho de peso corporal da data da hepatectomia até a data do sacrifício. CO - grupo que recebeu ração controle e foi submetido à HP; Café - grupo que recebeu café adicionado à ração e foi submetido à HP; CO CA - grupo que recebeu ração controle e foi submetido ao modelo de hepatocarcinogênese HR; Café CA - grupo que recebeu café adicionado à ração e foi submetido ao modelo de hepatocarcinogênese HR Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Morfometria de LPN em cortes histológicos corados para G6Pase de animais submetidos ao modelo HR¹.

Grupo	Nº LPN/cm ²	% Área lesões /área tecido
CO CA (5) ²	41,52 ± 17,14 ^a	11,12 ± 2,59 ^a
Café CA (7)	9,14 ± 1,59 ^b	1,47 ± 0,264 ^b

¹ Resultados expressos como média ± erro padrão da média. ² Número de animais por grupo apresentado entre parênteses. CO CA - grupo que recebeu ração controle e foi submetido ao modelo de hepatocarcinogênese HR; Café CA - grupo que recebeu café adicionado à ração e foi submetido ao modelo hepatocarcinogênese HR. Letras sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

O café é uma mistura complexa de diferentes substâncias que são sugeridas como potenciais quimioprotetores em sistemas biológicos. Assim, os resultados do efeito do café sobre a carcinogênese hepática encontrados nesse estudo podem representar a ação combinada de constituintes da bebida, cujas atividades quimioprotetoras foram previamente demonstradas, como os ácidos clorogênicos (Shimizu et al., 1999) e os diterpenos caveol e cafestol (Huber et al., 1997; Cavin et al., 1998; Cavin et al., 2003; Majer et al., 2005).

Em adição, alguns mecanismos para a ação protetora *in vivo* do café podem ser sugeridos. O café torrado possui componentes com potente atividade antioxidante (Fuster et al., 2000; Yanagimoto et al., 2004), capazes de aumentar a atividade antioxidante *in vivo* (Natella et al., 2002), inibir a formação do radical peroxil *in vitro* e *ex vivo*, prevenir a peroxidação lipídica da membrana celular (Daglia et al., 2000; Daglia et al., 2004), bem como suprimir a mutagenicidade causada por oxidantes (Stadler et al., 1994). Como moduladores do balanço oxidativo no organismo, os constituintes antioxidantes do café podem inibir processos oxidativos ligados à carcinogênese, especialmente às etapas de iniciação e promoção do processo (Klaunig et al., 1998). Além da ação dos constituintes antioxidantes presentes na bebida, resultados do nosso grupo mostram o efeito da ingestão diária do café sobre o sistema antioxidante endógeno,

levando ao aumento do conteúdo de glutathione, e inibição da peroxidação lipídica (Abreu, 2005). Este aumento no conteúdo de glutathione e na atividade das conjugases glutathione S-transferase e UDP-glicuronosiltransferases, importantes enzimas de desintoxicação, reforçam a possibilidade de proteção contra a hepatocarcinogênese modulada pela ingestão de café (Huber et al., 2003; Turesky et al., 2003).

CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram que a ingestão diária de café exerce ação moduladora sobre a hepatocarcinogênese em ratos Wistar submetidos ao modelo HR, como ficou demonstrado pelo menor número e tamanho das LPN nos animais que receberam ração adicionada com café.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, R.V. *O sistema de biotransformação hepático, induzido pela desnutrição e pelo paracetamol, é modulado pela ingestão de café*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2005. 64 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- CAVIN, C.; BEZENCON, C.; GUIGNARD, G.; SCHILTER, B. Coffee diterpenes prevent benzo[a]pyrene genotoxicity in rat and human culture systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 306, p. 488-495, 2003.
- CAVIN, C.; HOLZHAEUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W.W.; SCHILTER, B. Cafestol and Kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem. Toxicol.*, v. 40, p. 1155-1163, 2002.
- CAVIN, C.; HOLZHÄUSER, D.; CONSTABLE, A.; HUGGETT, A.C.; SCHILTER, B. The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol protect against aflatoxin B1-induced genotoxicity through a dual mechanism. *Carcinogenesis*, v.19, n.8, p.1369-1375, 1998.
- DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; GREGOTTI, C.; BERTÈ, F.; GAZZANI, G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 48, p. 1449-1454, 2000.
- DAGLIA, M.; RACCHI, M.; PAPETTI, A.; LANNI, C.; GOVONI, S.; GAZZANI, G. In vitro and ex vivo antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* v. 52, p. 1700-1704, 2004.
- DEVASAGAYAM, T.P.A.; KAMAT, J.P.; MOHAN, H.; KESAVAN, P.C. Caffeine as an antioxidant: Inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1282, p. 63-70, 1996.
- FARBER, E.; RUBIN, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. *Cancer Res.*, v. 51, p. 2751-2761, 1991.
- Farber E: The multistep nature of cancer development. *Cancer Res* 44, 4217-4223, 1984.
- FUSTER, M.D.; MITCHELL, A.E.; OCHI, H.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 5600-5603, 2000.
- GELATTI, U.; COVOLO, L.; FRANCESCHINI, M.; PIRALI, F.; TAGGER, A.; RIBERO, M.L.; TREVISI, P.; MARTELLI, C.; NARDI, G.; DONATO, F. Coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma independently of its aetiology: A case-control study. *J. Hepatol.*, v. 42, p. 528-534, 2005.
- 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.
- HUBER, W. W.; SCHARF, G.; NAGEL, G.; PRUSTOMERSKY, S.; SCHULTE-HERMANN, R.; KAINA, B. Coffee and its chemopreventive components kahweol and cafestol increase the activity of *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in rat liver – comparison with phase II xenobiotic metabolism. *Mutat. Res.*, v. 522, p. 57-68, 2003.
- HUBER, W.W.; MCDANIEL, L.P.; KADERLIK, K.R.; TEITEL, C.H.; LANG, N.P.; KADLUBAR, F.F. Chemoprotection against the formation of colon DNA adducts from the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-*b*)pyridine (PhIP) in the rat. *Mutat. Res.*, v. 376, p. 115-122, 1997.
- INOUE, M.; YOSHIMI, I.; SOBUE, T.; TSUGANE, S. Influence of coffee drinking on subsequent risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study in japan. *J Natl Cancer Inst* 97, 293-300, 2005.
- KERMODE-SCOTT, B. Coffee is associated with lower risk of breast cancer in women with BRCA mutations. *BMJ* 332, 70, 2006.
- KITAGAWA, T.; PITOT, H.C. The regulation of serine dehydratase and glucose-6-phosphatase in hyperplastic nodules of rat liver during diethylnitrosamine and N-2-fluorenylacetamide feeding. *Cancer Res.*, v. 35, p. 1075-1084, 1975.
- KLAUNIG, J.E.; XU, Y.; ISENBERG, J.S.; BACHOWSKI, S.; KOLAJA, K.L.; JIANG, J.; STEVENSON, D.E.; WALBORG, E.F. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 106, 289-295, 1998.
- MAJER, B.J.; HOFER, E.; CAVIN, C.; LHOSTE, E.; UHL, M.; GLATT, H.R.; MEINL, W.; KNASMÜLLER, S. Coffee diterpenes prevent the genotoxic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) and N-nitrosodimethyl amine in a human derived liver cell line (HepG2). *Food Chem. Toxicol.*, v. 43, p. 433-441, 2005.

- MENDILAHARSU, M.; DE STEFANI, E.; DENEOPELLEGRINI, H.; CARZOGLIO, J.C.; RONCO, A. Consumption of tea and coffee and the risk of lung cancer in cigarette-smoking men: A case control study in Uruguay. *Lung Cancer*, v. 19, p. 101-107, 1998.
- NATELLA, F.; NARDINI, M.; GIANNETTI, I.; DATTILO, C.; SCACCINI, C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 6211-6216, 2002.
- OGAWA, K.; SOLT, D.B.; FARBER, E. Phenotypic diversity as an early property of putative preneoplastic hepatocyte populations in liver carcinogenesis. *Cancer Res.*, v. 40, p. 725-733, 1980.
- OHFUJI, S.; FUKUSHIMA, W.; TANAKA, T.; HABU, D.; TAMORI, A.; SAKAGUCHI, H.; TAKEDA, T.; KAWADA, N.; SEKI, S.; NISHIGUCHI, S.; SHIOMI, S.; HIROTA, Y. Coffee consumption and reduced risk of hepatocellular carcinoma among patients with chronic type C liver disease: A case-control study. *Hepatol. Res.*, v. 36, p. 201-208, 2006.
- SHIMIZU, M.; YOSHIMI, N.; YAMADA, Y.; MATSUNAGA, K.; KAWABATA, K.; HARA, A.; MORIWAKI, H.; MORI, H. Suppressive effects of chlorogenic acid on N-methyl-N-nitrosourea-induced glandular stomach carcinogenesis in male F344 rats. *J. Toxicol Sci* 24, 433-439, 1999.
- SOLT, D.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, v. 263, p. 701-703, 1976.
- STADLER, R.H.; TURESKY, R.J.; MÜLLER, O.; MARKOVIC, J.; LEONG-MORGENTHALER, P.M.. The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity. *Mutat. Res.*, v. 308, p. 177-190, 1994.
- TANAKA, T.; NISHIKAWA, A.; SHIMA, H.; SUGIE, S.; SHINODA, T.; YOSHIMI, N.; IWATA, H.; MORI, H. Inhibitory effects of chlorogenic acid, reserpine, polyphenolic acid (E-5166), or coffee on hepatocarcinogenesis in rats and hamsters. *Basic Life Sci.*, v. 52, p. 429-440, 1990.
- TANAKA, K.; HARA, M.; SAKAMOTO, T.; HIGAKI, Y.; MIZUTA, T.; EGUCHI, Y.; YASUTAKE, T.; OZAKI, I.; YAMAMOTO, K.; ONOHARA, S.; KAWAZOE, S.; SHIGEMATSU, H.; KOIZUMI, S. Inverse association between coffee drinking and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in Japan. *Cancer Sci* 98, 214-218, 2007.
- TATEMATSU, M.; NAGAMINE, Y.; FARBER, E. Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. *Cancer Res.*, v. 43, p. 5049-5058, 1983.
- TAVANI, A.; BERTUZZI, M.; TALAMINI, R.; GALLUS, S.; PAPPALARDI, M.; FRANCESCHI, S.; LEVI, F.; LA VECCHIA, C. Coffee and tea intake and risk of oral, pharyngeal and esophageal cancer. *Oral Oncol.*, v. 39, p. 695-700, 2003.
- TSUDA, H.; LEE, G.; FARBER, E. Induction of resistant hepatocytes as a new principle for a possible short-term *in vivo* test for carcinogens. *Cancer Res* 40, 1157-1164, 1980.
- TURESKY, R.J.; RICHOS, J.; CONSTABLE, A.; CURTIS, K.D.; DINGLEY, K.H.; TURTELTAUB, K.W. The effects of coffee on enzymes involved in metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine in rats. *Chem Biol Interact* 145, 251-265, 2003.
- WACHSTEIN, M.; MEISEL, E. On the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 4, p. 592, 1956. (carta ao editor).
- YANAGIMOTO, K.; OCHI, H.; LEE, K-G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 592-596, 2004.