



Aspectos da quimioprevenção do câncer com compostos bioativos presentes nos alimentos

Renato Heidor

Juliana Festa Ortega

Fernando Salvador Moreno

▣ INTRODUÇÃO

A ideia de que a alimentação e o estado nutricional podem influenciar a carcinogênese, ou seja, o desenvolvimento do câncer ou de neoplasias, não é algo novo. Os primeiros estudos epidemiológicos que procuraram avaliar a relação alimentação-câncer ocorreram há quase 100 anos. Nesses trabalhos, foram identificadas distorções nos padrões alimentares como fatores de risco, especialmente a ingestão reduzida de frutas e hortaliças⁹⁰.

Os primeiros trabalhos que relacionavam alimentação e o desenvolvimento de neoplasias em animais de experimentação ocorreram na década de 1940. Nesses estudos, observou-se que camundongos submetidos à restrição alimentar apresentavam menor número de neoplasias cutâneas espontâneas e/ou induzidos por aplicação via dérmica de benzo[a]pireno do que animais alimentados *ad libitum* ou com livre acesso à ração. Além disso, animais alimentados com rações apresentando elevado conteúdo calórico e/ou lipídico tinham maior incidência de cânceres de mama induzidos por carcinogênicos químicos⁷⁹.

Porém, um maior interesse pelas causas nutricionais do câncer começou apenas a ocorrer, na verdade, a partir das décadas de 1960 e 1970. Durante esse período, diversos estudos epidemiológicos investigaram o padrão de incidência de neoplasias na população^{22,91}. Esses trabalhos compararam a média de ingestão de certos alimentos entre países com elevada e reduzida incidência de câncer, possibilitando que se chegasse à conclusão de que fatores nutricionais desempenhavam, efetivamente, importante papel na etiologia e, inclusive, na prevenção da carcinogênese. Dentre essas conclusões, provavelmente a mais consistente foi a relação inversa entre risco para certos tipos comuns de câncer e a ingestão de frutas e hortaliças, grãos integrais, cereais e alguns tipos de lipídios, tais como os ácidos graxos ômega-3.

Assim, alguns estudos merecem destaque devido às suas contribuições para o maior conhecimento da relação entre alimentação, nutrição e câncer na época, como o fato de se ter observado aumento das taxas de cânceres de cólon e mama em japoneses migrantes para os EUA, o que sugere a influência do meio ambiente na carcinogênese, incluindo a alimentação⁹².

Assim, foi sugerido que 80 a 90% dos cânceres se devem a fatores externos, sendo, portanto, teoricamente passíveis de prevenção. No início da década de 1980 aventou-se que com modificações na alimentação seria possível uma redução de 35% (com uma variação de 10-70%) na mortalidade por câncer nos EUA²¹.

Com base nesses estudos, órgãos governamentais e agências de prevenção contra o câncer fizeram as primeiras recomendações que aconselhavam a população a reduzir a ingestão de gorduras, principalmente as de origem animal, aumentar a ingestão de fibras alimentares, consumir grande variedade de frutas e hortaliças e moderação na ingestão de sal e bebidas alcoólicas, além de incentivar a prática de atividade física.

Recentemente, autores relatam a existência de evidências experimentais e/ou epidemiológicas de que compostos bioativos presentes nos alimentos (CBAs), como polifenóis e derivados isoprênicos, possam estar relacionados com a redução do risco de desenvolvimento do câncer.

▣ CARCINOGENESE

Tradicionalmente, a carcinogênese é o resultado de eventos que ocorrem em múltiplas etapas, com acúmulo de alterações em genes envolvidos com a regulação de importantes sistemas celulares^{86,42}. Assim, esse processo é

longo, necessitando para isso de metade a dois terços da vida das diferentes espécies²⁷. Entretanto, o número exato de etapas que compõem a carcinogênese é bastante discutível, havendo evidências de que a neoplasia ocorra em três estágios básicos: iniciação, promoção e progressão⁵⁷ (Figura 46.1).

O primeiro estágio, conhecido como iniciação, caracteriza-se por alterações permanentes e irreversíveis no material genético da célula iniciada. Por outro lado, a promoção não envolve mudanças moleculares na estrutura do DNA. Esta etapa tem sido definida como operacionalmente reversível, de longa duração e em cujo período ocorre a expansão clonal das células⁵⁷. O último estágio, a progressão, é irreversível, sendo caracterizado pela instabilidade cariotípica. Alterações na estrutura do genoma estão relacionadas, nessa etapa, com uma taxa de proliferação aumentada, caráter invasivo e alterações bioquímicas nas células⁵⁸.

O organismo é constantemente exposto a substâncias xenobióticas, ou seja, estranhas a ele, que podem causar o câncer. Neste caso, são conhecidas como carcinógenos. Alguns indivíduos podem desenvolver neoplasias após exposição a um carcinógeno, enquanto outros não sofrerão esse efeito sob influência do mesmo estímulo. Essa suscetibilidade pode estar relacionada à capacidade de metabolizar xenobióticos, ou,

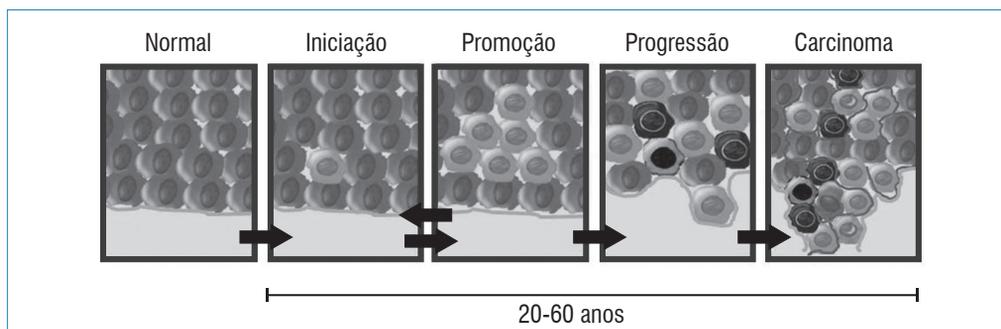


FIGURA 46.1 Os estágios básicos da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão. Durante a iniciação ocorrem alterações permanentes e irreversíveis no DNA da célula iniciada. Na fase de promoção, não ocorrem mudanças moleculares na estrutura do DNA, por isso é considerada uma etapa reversível. A progressão é o último estágio, caracterizada pela instabilidade cariotípica e irreversibilidade.

ainda, de reparar os danos causados por eles. A resposta do organismo a substâncias nocivas depende da presença de variações na sequência do DNA (polimorfismos) de determinados genes que expressam enzimas responsáveis pela detoxificação⁴⁵. Os carcinógenos são, em geral, eletrofílicos, ou se tornam após ação dessas enzimas, que podem ser classificadas como de fase I e fase II. As enzimas de fase I, como a citocromo P450, promovem oxidação, redução ou hidrólise do agente carcinogênico. Já as de fase II, como a glutatona-S-transferase, estão envolvidas com a adição de uma espécie química ao xenobiótico, previamente metabolizado ou não, que vai torná-lo hidrossolúvel, possibilitando sua excreção pela urina. A ação dessas enzimas pode algumas vezes tornar o xenobiótico um carcinógeno ou ainda aumentar seu potencial cancerígeno (ativação). Essas substâncias podem se ligar a centros nucleofílicos do DNA, formando produtos estáveis conhecidos como adutos. A formação de adutos é característica de substâncias genotóxicas e pode resultar em modificações genéticas. Isto é, se a divisão celular ocorrer antes da ação do mecanismo de reparo do DNA sobre esse aduto, o dano pode ser fixado no material genético das células-filhas por alterações na sequência de bases, caracterizando mutação²⁰.

Genes estimuladores da proliferação celular incluem os proto-oncogenes, ao passo que os inibidores são os supressores de tumor. Estes últimos modulam a progressão do ciclo celular, mantendo a célula em latência, ou induzindo sua morte, caso as condições de progressão do ciclo celular não estejam apropriadas. Mutações ou modificações na expressão desses genes conferem à célula vantagens de crescimento e desenvolvimento em relação às células normais. Os genes supressores de tumor estão envolvidos com a inibição da expressão do fenótipo maligno, podendo ser inativados por mutações durante o processo da carcinogênese. Uma mutação que iniba esses genes poderá resultar na perda de mecanismos naturais de controle da

proliferação, tendo por consequência a multiplicação excessiva das células. Os proto-oncogenes estão relacionados com a divisão e a diferenciação celular normal. 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 externos¹⁹.

Além disso, o destino da célula é controlado por genes que estimulam a morte celular programada (apoptose). Esta representa um mecanismo de proteção contra a transformação e o desenvolvimento da neoplasia, que elimina células com dano genético ou que não respondam a estímulos proliferativos. A indução de apoptose ocorre por estímulos em diversos receptores como fator de necrose tumoral e outros. Estes iniciam uma cascata de sinalização que induz à ativação de caspases, enzimas responsáveis pela degradação de proteínas celulares necessárias para a manutenção da vida e da integridade celular. O processo de apoptose envolve também a mitocôndria, que libera diversas proteínas que podem migrar para o núcleo da célula e promover a condensação e fragmentação do DNA, ou ainda inibir proteínas supressoras da apoptose. O processo de apoptose é regulado por diversas proteínas, destacando-se a p53, que consiste em uma supressora de tumor e se encontra envolvida com reparo do DNA, controle do ciclo celular e indução da morte celular programada⁵⁶.

A etapa de progressão do câncer envolve também eventos bioquímicos extracelulares que estão associados com a perda de comunicação entre a célula neoplásica e as outras células da vizinhança. Esses eventos estimulam a produção de enzimas proteolíticas, como metaloproteinases de matriz (MMPs), que atuam degradando a matriz extracelular e liberando a célula para ser transportada pela corrente sanguínea. A presença de enzimas proteolíticas e de fatores de crescimento, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), estimula deter-

minadas células, como fibroblastos e endoteliais da parede interna dos vasos sanguíneos, a proliferarem, formando novas artérias e veias (angiogênese). Isso consiste em um processo seletivo e complexo, que envolve a alteração de vários genes⁷².

Comunicações intercelulares do tipo hiato (*gap junctions intercellular communications* – GJIC) constituem a única estrutura conhecida que permite a comunicação citosólica direta entre células. Por meio das GJIC são veiculados fatores de importância fundamental para a manutenção da homeostase dos tecidos e do controle de diferenciação e proliferação celulares. Junções intercelulares deficientes podem levar à proliferação celular desordenada observada no câncer⁸¹.

Tem-se considerado a instabilidade genômica como importante fator na formação e na progressão do câncer. Quando ocorre uma alteração no DNA, o sistema de reparo procura por seu conjunto de genes (*Msh1*, *Mlh*, *Pms1* e outros) para corrigir a falha. Quando ocorrem grandes danos em seu material genético e o sistema de reparo do DNA não é eficiente, a célula está sujeita a alterações grosseiras, como perdas de material cromossômico, ampliações, duplicações ou inversão de genes, translocações e substituição de pares de bases. Dessa forma, algumas dessas células adquirem resistência à quimioterapia e à radioterapia⁶².

▣ QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER

A quimioprevenção do câncer foi definida pela primeira vez em 1976 e pode ser considerada uma forma de prevenir a doença com a intervenção com compostos sintéticos ou naturais durante as etapas iniciais da carcinogênese, ou seja, antes do estabelecimento da etapa de progressão²⁸.

Assim, em primeira instância, o método mais adequado para se eliminar o impacto do câncer em seres humanos é a prevenção. Nesse

sentido, o grupo inicial de medidas visando-se esse objetivo consiste na remoção do agente etiológico, ou seja, na prevenção primária do câncer. Isso em alguns casos é possível, como em relação ao hábito de fumar. Em outras situações, entretanto, torna-se um objetivo dificilmente alcançável, como é o caso de lesões no DNA desencadeadas por exposição a xenobióticos, por exemplo. Nesse sentido, podem-se conceber, em princípio, dois tipos básicos de quimioprevenção. O primeiro é voltado principalmente para o fornecimento de agentes quimiopreventivos aplicáveis a grandes grupos populacionais, culminando, inclusive, como medidas de saúde pública em larga escala. Neste caso, os compostos quimiopreventivos deveriam apresentar toxicidade reduzida. O segundo tipo de estratégia quimiopreventiva poderia estar direcionado a indivíduos considerados de “alto risco”, devido a predisposições genéticas, como a polipose adenomatosa familiar, ou maior exposição a carcinógenos, como pessoas que tinham o hábito de fumar. Outras populações-alvo incluiriam indivíduos portadores de lesões reconhecidas pré-neoplásicas, como displasia cervical, e pacientes previamente tratados devido a um câncer. Este último caso merece destaque, uma vez que alguns tipos de neoplasias apresentam elevada recorrência, como carcinoma hepatocelular (HCC). Indivíduos com HCC que foram submetidos à ressecção cirúrgica ou ablação percutânea apresentam, em 70% dos casos, recorrência da doença em um estágio mais agressivo⁴³.

À medida que o câncer se torna mais agressivo, os compostos mais eficazes seriam aqueles que suprimem a evolução do processo neoplásico. Nesses casos, agentes quimiopreventivos que apresentam maior toxicidade, como os retinoides, poderiam ser tolerados.

É grande o número de compostos até agora identificados com eventual atividade quimiopreventiva contra o câncer.²⁸ Essa diversidade pode ser um fator positivo, pois indica que diversas

abordagens poderão ser empregadas visando-se à prevenção, além de possibilitar outras opções para a seleção dos agentes mais indicados a cada caso. Além disso, a carcinogênese é um processo complexo, com evolução prolongada e diversificada. Quanto mais complexo e prolongado o processo patológico, maior é o número de possibilidades de se empregar medidas capazes de interromper sua ocorrência final³⁵.

Agentes quimiopreventivos podem ser classificados em bloqueadores ou supressores, atuando especificamente durante as fases de iniciação e promoção da carcinogênese, respectivamente. Alguns compostos podem atuar em ambas as etapas, sendo classificados como bloqueadores e supressores do processo neoplásico. A caracterização dos mecanismos quimiopreventivos dos agentes bloqueadores e supressores em modelos *in vivo* pode contribuir para a elucidação de aspectos fundamentais da carcinogênese e para a seleção de agentes quimiopreventivos para serem utilizados em seres humanos⁵⁴.

Diversos agentes quimiopreventivos até agora identificados são CBAs presentes, principalmente, em frutas e hortaliças. Esses compostos são pleiotrópicos, ou seja, atuam em

diversas vias moleculares relacionadas com a carcinogênese. Assim, podem inibir a proliferação celular, induzir a apoptose, aumentar a expressão de genes supressores de tumor ou inibir a expressão de oncogenes. Para tanto, CBAs podem modular a carcinogênese por mecanismos genéticos, epigenéticos ou ambos²⁸ (Figura 46.2).

Os CBAs apresentam diferentes estruturas químicas (Figura 46.3), entretanto eles podem ser agrupados em famílias com similaridade estrutural, como os polifenóis e os derivados isoprênicos. Devido à importância desses compostos na prevenção e manutenção da saúde humana, os mecanismos de ação dos CBAs vêm sendo investigados, inclusive no contexto da quimioprevenção do câncer.

▣ QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER COM POLIFENÓIS

Os polifenóis são um numeroso grupo de moléculas originadas no metabolismo secundário de vegetais, como frutas, hortaliças e produtos derivados, como café, chá e o vinho. Uma vez que a reduzida incidência de neoplasias em

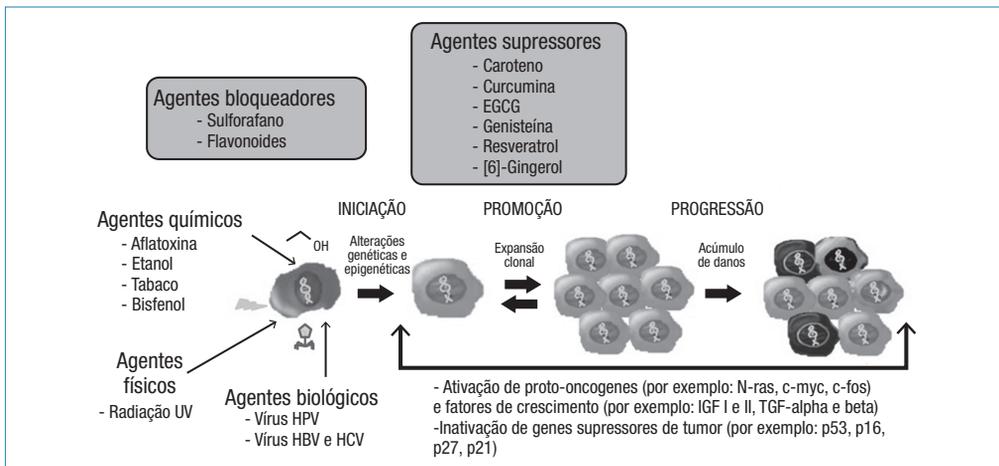


FIGURA 46.2 Quimiopreventivos podem atuar como bloqueadores inibindo iniciação das células por agentes químicos, físicos ou biológicos. Supressores atuam especificamente durante a promoção da carcinogênese, impedindo a expansão clonal das células iniciadas, assim como a ativação de proto-oncogenes e inibição de genes supressores de tumor.

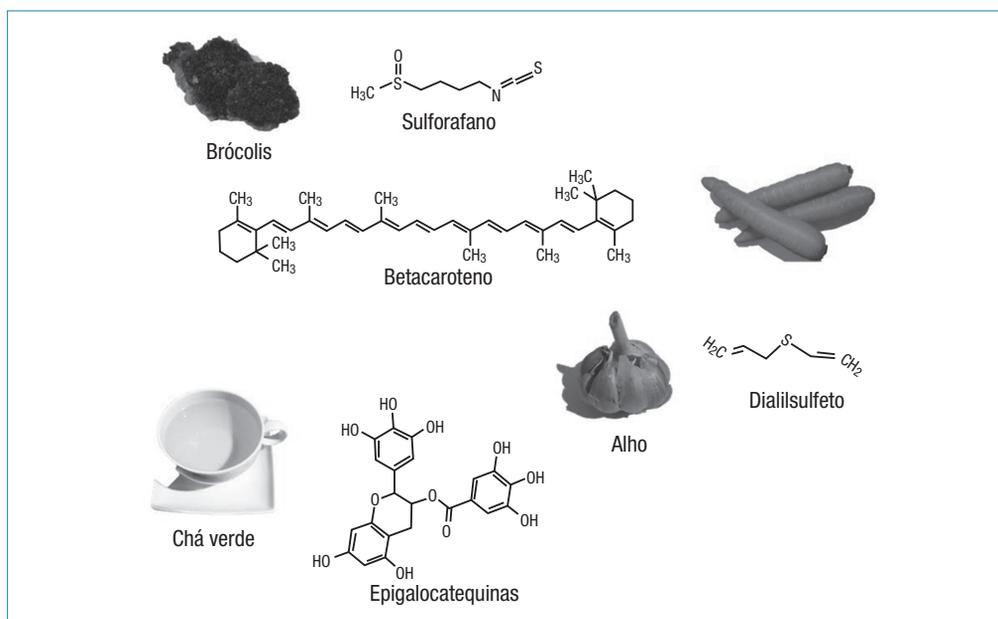


FIGURA 46.3 Diversidade estrutural de alguns agentes quimiopreventivos e suas principais fontes na alimentação.

determinas populações pode estar relacionada ao consumo de alimentos que são fontes de polifenóis, diversos estudos investigam os mecanismos de ação quimiopreventiva do câncer desses compostos⁸⁵. Alguns dos polifenóis mais estudados são a **curcumina**, que é utilizada como tempero e corante alimentício, a **epigallocatequina-3-galato (EGCG)**, que está presente no chá verde e o **resveratrol**, presente em uvas e no vinho.

Curcumina

A curcumina, um pigmento amarelo presente no rizoma da cúrcuma (*Curcuma longa*), é utilizada como tempero, principalmente na culinária indiana, e também é um dos principais polifenóis investigados em estudos de quimioprevenção do câncer. Apresenta atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antissépticas e antiangiogênicas que são exploradas há milhares de anos pela medicina tradicional oriental. Diversos estudos sugerem que a curcumina

apresenta atividades quimiopreventivas contra o câncer, como o de pâncreas, mieloma múltiplo e o de cólon. A atividade quimiopreventiva da curcumina pode estar relacionada com a sua capacidade de modular diversos mecanismos moleculares, como a proliferação celular, indução da apoptose e vias de sinalização celular, como a do fator nuclear κB (NF- κB , sigla do inglês *nuclear factor κB*)¹².

A curcumina inibe a proliferação celular de cultura de células humanas de câncer de mama, de bexiga e leucemia. Essa inibição pode estar relacionada com a redução da expressão de proteínas denominadas quinase dependente de ciclinas (CDK, sigla do inglês *cyclin-dependent kinase*)³⁸. A curcumina pode também inibir a proliferação celular atuando como um inibidor competitivo do trifosfato de adenosina (ATP) e consequentemente reduzindo a expressão de CDKs, como observado em cultura de células de neoplasias gástricas⁷. Foi também observado que, em culturas de células de câncer de próstata, a curcumina inibe a proliferação celular

induzindo a expressão de proteínas que inibem CDKs, como a p16, p21 e p27⁷⁴.

O tratamento de células epiteliais humanas de cólon com curcumina inibiu a ativação da via do NF- κ B, inibindo a degradação de uma proteína que controla essa via, denominada inibidor do κ B (I κ B, sigla do inglês *inhibitor of kappa B*)⁷⁶. Foi demonstrado *in vitro* que o tratamento com esse polifenol inibiu o crescimento de células HA22T/VGH de câncer de fígado por aumento da apoptose, inibição da via do NF- κ B e redução da expressão do oncogenes, como o *c-myc*⁵³. Quando a curcumina foi aplicada topicamente no dorso de camundongos ICR fêmeas, ocorreu a inibição da via de sinalização do NF- κ B. A curcumina também inibiu o desenvolvimento de hiperplasia em ratos tratados com carcinógeno químico dietilnitrosamina. Neste caso, além da inibição da via do NF- κ B, observou-se nos animais que receberam o polifenol a redução pós-transcricional de p21 e p53¹⁰.

Epigallocatequina-3-galato (EGCG)

O chá verde é uma bebida consumida principalmente em países orientais. Foi demonstrado que o consumo de chá verde pode prevenir a carcinogênese em diferentes órgãos em modelos animais. O polifenol epigallocatequina-3-galato (EGCG) é o CBA, que pode estar relacionado com as atividades anticarcinogênicas do chá verde⁹³. Estudos *in vitro* com EGCG demonstram que esse CBA apresenta atividade quimiopreventiva contra neoplasias de cólon, pele, pulmão, fígado e mama⁹⁴.

Estudos epidemiológicos conduzidos no Japão sugerem a atividade quimiopreventiva da EGCC contra o câncer de mama. Esses efeitos foram também observados em diversos trabalhos conduzidos *in vitro* e *in vivo*. A EGCG induz a apoptose e inibe a proliferação celular por ativar caspases e suprimir a via de sinalização do NF- κ B. Dentre os diversos mecanismos

de ação da EGCG destacam-se suas atividades antioxidantes, como a inibição da oxido nítrico sintase ocasionada pelo bloqueio da via do NF- κ B. Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que esse CBA atua como quimiopreventivo em modelos de carcinogênese induzidos por radiação ultravioleta ou por metais pesados⁹⁴. A aplicação tópica de 6,6 μ M pode inibir a formação de neoplasias induzidas por radiação ultravioleta do tipo B (UVB) em camundongos, induzindo a apoptose seletivamente em células pré-neoplásicas⁴⁴.

Outros estudos sugerem que a EGCC pode também inibir a angiogênese, reduzindo a expressão de proteínas, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, sigla do inglês *vascular endothelial growth factor*) e metalopetidase de matriz 9 (MMP-9, sigla do inglês *matrix metalloproteinase*), conforme observado em modelos *in vivo* de câncer de mama.⁴⁰ As atividades quimiopreventivas da EGCC na carcinogênese de mama também podem estar relacionadas com a modulação da expressão de genes estimulados pelo estrógeno, como para o receptor de progesterona.

Resveratrol

O resveratrol, um polifenol produzido pelas uvas, também é encontrado no vinho. A sua concentração no vinho depende do cultivar da uva, variando de 0,2 a 5,8 mg/L no vinho tinto e 0,68 mg/L no vinho branco. Diversos estudos epidemiológicos sugerem a redução na incidência de doenças coronarianas com o consumo moderado de vinho tinto. O resveratrol é um inibidor da agregação plaquetária, modula a síntese de eicosanoides, além de alterar o metabolismo de lipoproteínas²³.

O resveratrol também é um agente quimiopreventivo, atuando nas diversas etapas da carcinogênese. Um dos mecanismos de ação desse CBA é a inibição da proliferação celular, que ocorre por fosforilação da PI3K/AKT. O

resveratrol, além de inibir a proliferação celular, induz a apoptose e a diferenciação em diversas células neoplásicas, como de hepatoma, neuroblastoma, leucemia, próstata, cólon, estômago e mama⁴¹. Foi observado *in vitro* que o resveratrol pode induzir a apoptose em diversas linhagens de células neoplásicas, como as de neuroblastoma, meduloblastoma e glioblastoma. Porém, esse efeito não foi observado em fibroblastos normais, sugerindo a especificidade desse CBA em induzir a apoptose em células cancerosas⁴¹.

O resveratrol apresenta, como outros polifenóis, atividade antioxidante. Assim, esse CBA pode induzir indiretamente a via molecular do Nrf2, que leva a transcrição de diversas enzimas antioxidantes. Em células de mieloma múltiplo, o resveratrol inibe a angiogênese e a metástase, modulando a expressão de proteínas como o VEGF, β -catenina, e MMP-9⁴¹.

▣ QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER COM DERIVADOS ISOPRÊNICOS

Os derivados isoprênicos consistem em uma classe de compostos com mais de 22.000 constituintes que incluem carotenoides, como o β -caroteno e o licopeno, retinoides, monoterpênos, diterpênos e triterpênos. Os derivados isoprênicos são produzidos pela via do mevalonato em frutas e hortaliças. Porém, em mamíferos e seres humanos, essa via é utilizada para a síntese do colesterol. A via do mevalonato é regulada pela enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), que é responsável pela conversão da HMG-CoA em mevalonato, resultando em intermediários isoprenoides, como o pirofosfato de farnesila e geranylgeranila. Esses isoprenoides são necessários para a isoprenilação pós-translacional de várias proteínas como a Ras e Rho, que estão envolvidas com a proliferação celular. A perda dos mecanismos de regulação da HMG-CoA redutase é um alvo importante no contexto da

quimioprevenção do câncer. Nesse sentido, a inibição da HMG-CoA redutase por isoprenoides e a modulação de alvos moleculares em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas poderia ser a base para a seleção de derivados isoprênicos⁵⁴.

β -caroteno

O β -caroteno (β C) é considerado a pró-vitamina A mais importante. Estudos epidemiológicos demonstraram a relação inversa entre a incidência de diversos tipos de câncer, principalmente pulmão e estômago, com as concentrações de carotenoides no sangue. Como essas concentrações são reflexo do consumo de frutas e hortaliças, concluiu-se, nesses estudos, que o β C apresentaria atividades quimiopreventivas do câncer quando ingerido em quantidades fisiológicas, ou seja, cerca de 4 a 6 mg/dia, e que teria principalmente ação nas etapas iniciais da carcinogênese⁷⁸.

Assim, a consistência dos resultados dos estudos epidemiológicos em relação aos carotenoides e a prevenção do câncer de pulmão, além de estudos que demonstraram a ausência de toxicidade do β C e a sua eficácia em modelos de carcinogênese *in vivo*, serviram de estímulo para o desenvolvimento de estudos em grande escala em seres humanos. Porém, não foi verificado qualquer efeito protetor na incidência de diversos cânceres quando o β C foi administrado isoladamente ou em combinação com a vitamina A. Alguns desses estudos chegaram a demonstrar, inclusive, que o β C poderia ter um efeito deletério, aumentando a incidência de câncer de pulmão⁷⁸.

Como essas investigações foram conduzidas em populações consideradas “de alto risco” para o desenvolvimento de câncer de pulmão (fumantes, ex-fumantes ou indivíduos expostos ao amianto) e com suplementos administrados em doses farmacológicas em uma fase em que já era possível que neoplasias se encontrassem em estágio mais avançado, sugeriu-se que os

resultados negativos não devem ser generalizados para toda a população. Assim, não se deveria descartar um possível papel do β C na prevenção do câncer, especialmente se esse carotenoide fosse administrado em fases iniciais da carcinogênese, em doses fisiológicas e associado com compostos antioxidantes, como aqueles encontrados na alimentação rica em frutas e hortaliças⁵¹.

Assim, demonstrou-se que o β C apresenta atividades quimiopreventivas dos cânceres de esôfago e estômago quando administrado em concentrações menores do que as de outros estudos e associado com a vitamina E e selênio a milhares de indivíduos na China⁵.

A administração de β C apresenta efeitos inibitórios em modelos de carcinogênese *in vivo*^{11,16,37,49,63,68}. Além disso, os efeitos quimiopreventivos do β C foram confirmados por outros estudos realizados em diversas espécies de animais tratados com o carotenoide em diferentes modelos experimentais^{4,30,32,67,69,70,71,83}, inclusive durante fases mais tardias da carcinogênese⁴⁸. Alguns mecanismos envolvidos em seus efeitos inibitórios incluem a modulação de antioxidantes e sistemas de detoxificação de carcinógenos, inibição da proliferação celular e danos no DNA, assim como a modulação da diferenciação celular.

O efeito bloqueador do β C foi associado à modulação de enzimas hepáticas de fases I e II para o metabolismo de carcinogênicos⁷⁰. Os efeitos bloqueadores do β C também envolvem suas ações antioxidantes, com a consequente prevenção de peroxidação lipídica e danos em proteínas de membrana de eritrócitos⁷¹. A regulação da expressão de HMG-CoA-redutase representa outro aspecto importante dos efeitos quimiopreventivos dos carotenoides^{47,76}. A administração de β C por 3 semanas consecutivas a ratos submetidos à hepatectomia parcial em 70% inibiu a expressão de HMG-CoA-redutase por mecanismos pós-transcricionais, sugerindo que o metabolismo do isoprenoide está relacionado a sua atividade quimiopreventiva⁵².

Os mecanismos moleculares relacionados à atividade quimiopreventiva de carotenoides durante a hepatocarcinogênese podem incluir a diferenciação celular e a comunicação intercelular pelas junções intercomunicantes (*gap junctions*)⁸⁹. As células progenitoras ativadas (células-tronco) no fígado de animais adultos geram as células ovais (células pequenas com núcleo oval observadas no espaço porta), as quais proliferam durante as fases iniciais da hepatocarcinogênese e podem se diferenciar em hepatócitos e células do epitélio biliar⁸⁰. Além disso, as células ovais podem originar cânceres hepáticos pelo bloqueio irreversível do processo normal de diferenciação^{31,34,80,97}. Em modelo de hepatocarcinogênese experimental, o β C inibiu o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas, acompanhado pela redução do número de células ovais, evidenciando a ação do carotenoide no processo de diferenciação celular^{11,47,49,63}. A diferenciação das células ovais em hepatócitos é acompanhada pela troca da expressão de conexina 43 (células ovais) pela expressão de conexinas 32 e 26 (de hepatócitos) no fígado de ratos⁹⁷. Os carotenoides são conhecidos por aumentar a produção de conexinas em células de câncer de fígado. De fato, a maior expressão de conexinas nessas células ameniza o fenótipo tumorigênico pela inibição da proliferação celular e promoção da morte das células. Nesse sentido, as conexinas são alvos moleculares importantes para a quimioprevenção do câncer por carotenoides^{3,64}. Os efeitos do β C foram avaliados em um modelo *in vivo* de diferenciação celular. O carotenoide adiou a proliferação de células ovais e os picos de expressão de conexina 43, sugerindo a modulação do processo de diferenciação celular *in vivo*⁵¹.

Os carotenoides também regulam fatores de transcrição, como o receptor pregnane X (PXR), um receptor nuclear promíscuo envolvido com a proteção do organismo contra substâncias tóxicas. Ao contrário do licopeno, um isopre-

noide sem atividade pró-vitamina A, o β C ativou vias de metabolismo de xenobióticos e substâncias endógenas (citocromos CYP3A4/CYP3A7 e CYP3A5, assim como transportadores ABC transportes – MDR1/MRP2) responsivas a PXR em células HepG2⁶⁶. Assim, o β C tem sido apontado como um importante ativador de PXR, nutricionalmente relevante, que interfere no sistema metabólico do organismo⁶⁶.

Licopeno

O licopeno é um carotenoide encontrado principalmente no tomate. Não apresenta atividade pró-vitamínica A, porém é um dos mais potentes agentes antioxidantes naturais. Vários estudos experimentais e epidemiológicos têm demonstrado que uma dieta rica em carotenoides, inclusive o licopeno, está associada com menor incidência de diversos cânceres. No mesmo sentido, níveis séricos e teciduais reduzidos de licopeno são inversamente associados com a incidência de doenças crônicas, inclusive o câncer⁶¹.

Embora a atividade antioxidante do licopeno pareça ser a principal responsável pela sua atividade biológica, evidências como o aumento das comunicações celulares via *gap junctions*, a inibição da proliferação celular, a modulação do metabolismo de xenobióticos e do processo inflamatório são mecanismos de ação propostos para o licopeno⁶.

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado o papel do licopeno na quimioprevenção do câncer. O licopeno inibe o crescimento de células leucêmicas humanas, além de induzir a apoptose.¹ Efeito semelhante foi observado em culturas de células de câncer de próstata, endométrio e hepatoma⁸⁴.

O licopeno apresenta atividade quimiopreventiva em modelos de carcinogênese experimental de cólon e de mama, além de efeitos inibitórios da carcinogênese em modelos experimentais de câncer de pulmão, fígado e bexiga⁵⁵.

Porém, destaca-se a sua atividade quimiopreventiva do câncer de próstata. Diversos estudos epidemiológicos associaram a ingestão de alimentos fontes de licopeno com a redução na incidência de câncer de próstata. O consumo de tomates, molho ou suco de tomate e até mesmo de pizza (que responde por 82% da ingestão de licopeno) está associado com risco 35% menor de desenvolvimento de câncer de próstata^{29,84}.

EVENTOS EPIGENÉTICOS E QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER

O câncer desenvolve-se em um processo longo que envolve, além de alterações genéticas, a desregulação de eventos epigenéticos. Estes eventos são alterações na expressão gênica independentes de mudanças da sequência de nucleotídeos do DNA.³⁶ Eventos epigenéticos como a metilação do DNA, modificações em histonas e expressão de pequenos RNAs não codificantes (miRNAs, sigla do inglês *small non-coding microRNAs*) (Figura 46.4) estão presentes desde etapas precoces da carcinogênese e são potencialmente reversíveis, representando alvos potenciais para estratégias de prevenção do câncer³³.

Metilação do DNA

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais estudada⁷³. Ela é catalisada pela família de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), que adiciona grupo metila fornecido pela S-adenosil-metionina (SAM) no carbono 5 da citosina. Esta base nitrogenada está presente, principalmente, em regiões com sequências de dinucleotídeos constituídos por citosinas e guaninas denominada ilhas CpG, que estão frequentemente associadas com sítios de início de transcrição gênica. Uma condição comum em diversas neoplasias é a hipometilação genômica, ou seja, redução no número de citosinas metiladas, quando comparado ao

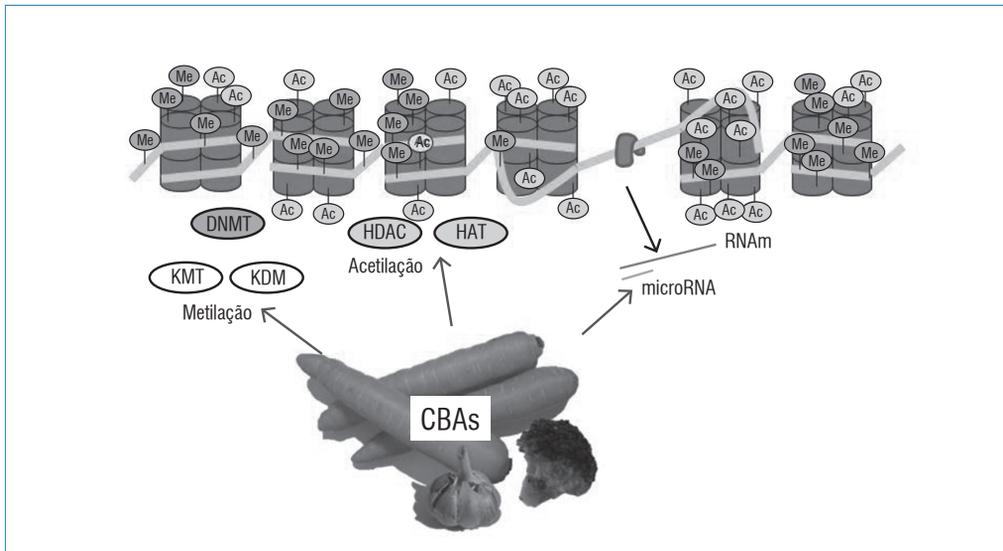


FIGURA 46.4 Papel dos CBAs na modulação de eventos epigenéticos desregulados do câncer. Os CBAs podem atuar na metilação do DNA, inibindo, por exemplo, DNMTs e assim restaurar a expressão de genes supressores de tumor silenciados por hipermetilação de suas regiões promotoras. Nesse sentido, podem também modular a trimetilação de histonas, em especial a da H3K9me3, que é regulada pelas enzimas KMT e KDM. CBAs também podem inibir a enzima HDAC, promovendo a hiperacetilação de histonas, como a H3K9ac. Tanto a remoção de grupos metila de regiões promotoras do DNA como a redução da trimetilação e aumento da acetilação de histonas como a H3 favorecem o acesso do complexo de transcrição ao DNA. CBAs podem também regular a expressão de microRNAs que se ligam ao RNAm inibindo a expressão de determinados genes.

tecido não neoplásico. Este evento pode ser resultado da disponibilidade reduzida de SAM, integridade genômica comprometida, como no caso de presença de lesões não reparadas no DNA ou, ainda, expressão ou atividade alterada de DNMTs, como a DNMT1, principal enzima responsável pela metilação do DNA. A hipometilação genômica pode contribuir com a carcinogênese por meio de diversos mecanismos, como a instabilidade cromossômica²⁴ e a indução da expressão de oncogenes, como o *c-myc*⁸.

Outro evento epigenético presente na carcinogênese que envolve a transferência de grupos metila é o silenciamento de genes específicos por hipermetilação. Esse processo é caracterizado pela metilação de domínios no DNA que geralmente estão presentes em ilhas CpG, localizadas em diversas regiões do genoma, principalmente na porção 5' de promotores de genes⁷².

Doadores de grupos metila, metilação do DNA e quimioprevenção do câncer

Doadores de grupos metila, como o ácido fólico, presente em diversas frutas e hortaliças, estão envolvidos tanto em processos de síntese como de metilação do DNA. Alguns estudos epidemiológicos demonstraram a associação inversa entre o consumo de ácido fólico e o risco de desenvolvimento do câncer, principalmente o de cólon, próstata, pâncreas, ovário e fígado. De forma geral, nos estudos em que se observou associação inversa entre o consumo de ácido fólico e a carcinogênese, ressalta-se que isso ocorreu apenas com o consumo da vitamina proveniente de formas naturais, ou seja, da alimentação, não sendo clara, até o momento, a associação entre o consumo de suple-

mentos dessa vitamina e o risco de desenvolvimento de neoplasias.⁹

Estudos com roedores demonstraram que a deficiência de compostos envolvidos com o metabolismo da SAM, como o ácido fólico, induz a hepatocarcinogênese.⁵⁹ Por outro lado, foi observada atividade quimiopreventiva em ratos submetidos a modelo de hepatocarcinogênese e tratados com ácido fólico, já que essa vitamina inibe a expressão de *c-myc* especificamente em lesões pré-neoplásicas⁹ e também de genes envolvidos com a angiogênese. Estudos em seres humanos indicam que concentrações plasmáticas reduzidas de folato estão associadas com aumento do risco de desenvolvimento de câncer de fígado⁹. Uma das hipóteses mais investigadas a respeito do papel do ácido fólico na hepatocarcinogênese é que a deficiência dessa vitamina está relacionada com a desregulação de eventos epigenéticos⁵⁹. Estudos com roedores demonstraram que a deficiência de doadores de grupo metila promove a desmetilação do DNA genômico hepático com consequente ativação de proto-oncogenes como *c-myc*, *c-fos* e *H-ras*⁸⁷. Animais tratados com dietas deficientes de doadores de grupo metila apresentaram hipermetilação de genes supressores de tumor como *p53*, *p16INK4a*, *PtprO*, *cdh1* e *Cx26*⁵⁹. Esse evento parece ocorrer antes do estabelecimento de lesões pré-neoplásicas, como observado em camundongos que receberam rações deficientes de ácido fólico⁸².

Retinoides, metilação do DNA e quimioprevenção do câncer

Uma vez que o fígado é considerado órgão-alvo para retinoides, supõe-se que essa classe de compostos sintéticos e naturais, que incluem o retinol, retinaldeído e ácido retinoico, apresente alguma ação na hepatocarcinogênese⁹⁶. Nesse sentido, observou-se em seres humanos a relação entre elevados níveis de retinol no sangue e redução no risco de desenvolvimento

do câncer. Os retinoides apresentam atividade quimiopreventiva da hepatocarcinogênese demonstrada em diversos estudos. Em um desses trabalhos, a vitamina A apresentou atividade quimiopreventiva da hepatocarcinogênese, especificamente durante a fase de progressão, mas seu mecanismo de ação não envolveu a reversão da hipometilação de *c-myc* e da HMGCoA redutase⁷⁷. Verificou-se que a região promotora de CRBP1 e RAR β , genes que atuam no transporte intracelular do retinol e como receptor de ácido retinoico, respectivamente, encontra-se hipermetilada em diversas células neoplásicas²⁵. Ainda nesse sentido, foi observado *in vivo* que o tratamento com palmitato de retinila e ácidos retinoicos 13-*cis* e todo *trans* promoveram aumento da expressão da glicina-N-metiltransferase, enzima necessária para o fornecimento ideal de grupos metila, que pode consistir em um mecanismo de ação epigenético dos retinoides⁶⁵.

Selênio, metilação do DNA e quimioprevenção do câncer

O selênio é um constituinte de selenoproteínas, que fazem parte de complexos sistemas enzimáticos envolvidos com o metabolismo antioxidante e destoxicante celular¹³. Diversos estudos demonstraram que esse mineral apresenta atividade anticâncer^{12,18}. Em seres humanos foi constatada a relação inversa entre concentrações plasmáticas de selênio e aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias⁹⁵. Evidências obtidas a partir de estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que as atividades quimiopreventivas do selênio estão relacionadas com alterações no padrão de metilação do DNA¹⁵. Esse efeito pode ser consequência da inibição da DNMT1 por parte do selênio, como demonstrado *in vitro*¹⁸. A modulação de eventos epigenéticos depende da estrutura química do selênio. Assim, em estudo *in vitro*, observou-se que o tratamento de células LNCaP de câncer de

próstata com esse mineral, na forma de selenito, restaurou a expressão de *GSTP1* que estava silenciada por metilação de seu promotor. Esse efeito ocorreu por redução da expressão de DNMT1, que foi acompanhada da hipometilação global do DNA. Quando as células foram tratadas com selenometionina, uma das formas orgânicas do selênio, esses efeitos não foram observados²².

Modificações em histonas

Modificações em histonas incluem acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, biotinizilação, sumolização e ADP-ribosilização. No câncer, as mais estudadas são a acetilação e a metilação⁶⁰. A acetilação de histonas relaxa a cromatina, que se encontra normalmente superespiralada. Esse processo permite o acesso de proteínas ligadoras do DNA e regulatórias da transcrição a regiões promotoras dos genes. A regulação do estado de acetilação das histonas ocorre pelas enzimas acetilases (HAT) que adicionam grupos acetila em resíduos de lisina ou arginina, e por desacetilases de histonas (HDAC) que removem o grupo acetila desses aminoácidos. Neoplasias apresentam, geralmente, desregulação de diversas HDACs, como HDAC1, HDAC2, HDAC3 e SIRT1. Por sua vez, a metilação de histonas ocorre também em resíduos de lisina ou arginina e pode ativar ou suprimir efetores da transcrição, dependendo da quantidade de grupos metila envolvidos. Metiltransferases de histonas (KMTs), como a SMYD3, RIZ1 e EZH2, catalisam a transferência de até 3 grupos metila da SAM para resíduos específicos de histonas, enquanto a remoção de grupos metila ocorre pela ação de desmetilases de histonas (KDMs)⁶⁰.

O silenciamento de genes supressores de tumor durante a hepatocarcinogênese, além de estar associado com a metilação do DNA, também está relacionado com modificações de histonas nas regiões promotoras desses genes⁶⁰. Assim, o silenciamento do RIZ1, p16INKa e

RASSF1A em neoplasias está relacionado com o aumento da expressão da histona H3 trimetilada nos resíduos de lisina 9 (H3K9me3) e 27 (H3K27me3) em suas regiões promotoras. Paralelamente, a carcinogênese, principalmente a de fígado, apresenta como característica a redução da expressão da histona H4 trimetilada no resíduo de lisina 20 (H4K30me3) e aumento na expressão da histona H3 trimetilada no resíduo de lisina 27 (H3K27me3)⁶⁰. CBAs podem modular o padrão de acetilação e metilação de histonas. Neste caso, esses compostos atuam principalmente como inibidores de enzimas como HDACs ou KMTs.

Butirato, modificação em histonas e quimioprevenção do câncer

O butirato, principal produto da fermentação de fibras alimentares, foi o primeiro composto natural a ser identificado com atividade inibitória de HDAC e tem sido considerado um agente potencial para quimioprevenção e quimioterapia do câncer³³. Esse ácido graxo atua como ligante fraco de HDAC, inibindo as HDACs das classes 1 e 2¹⁴ e promovendo a acetilação de histonas, levando à expressão, dessa forma, de genes envolvidos com a diferenciação celular e apoptose. Observou-se *in vitro* que o butirato inibiu a expressão de HDAC4 e aumentou a da histona H3 acetilada no resíduo de lisina 9 (H3K9ac) em células SMMC-7721 e HepG2. O butirato também inibiu a migração/invasão celular dessas células⁸⁸.

Apesar de seu potencial quimiopreventivo, principalmente por atuar como HDAC, o ácido butírico apresenta limitações farmacocinéticas para ser utilizado por via oral. Pró-fármacos de ácido butírico, como a tributirina, podem ser encontrados na gordura do leite. Esse triacilglicerol apresentou atividade quimiopreventiva em ratos submetidos a modelo de hepatocarcinogênese.³³ Além de induzir a apoptose, a tributirina aumentou a expressão do p21 e da H3K9ac e

também da H3K18ac e H4K16ac, além de inibir a desacetilação da p53, evento que garante a funcionalidade desta proteína em controlar o balanço apoptose/proliferação celular¹⁷.

Sulforafano, modificações em histonas e quimioprevenção do câncer

Dentre os isotiocianatos, o sulforafano e seus metabólitos apresentam atividade antineoplásica de acordo com diversos trabalhos³⁹. A erucina, um metabólito do sulforafano, apresenta atividade quimiopreventiva *in vivo* contra o câncer de fígado. Dentre os diversos mecanismos antineoplásicos do sulforafano, destaca-se sua atividade inibitória de HDACs²². Estudos de modelagem molecular sugerem uma interação entre o sítio ativo da HDAC com o grupo carboxilato do resíduo de lisina do sulforafano posicionado como um ligante de zinco bidentado. Demonstrou-se *in vitro* que esse CBA inibiu a atividade de HDAC e aumentou a expressão do supressor de tumor *p21* e do indutor da apoptose *Bax*. Foi observado em seres humanos saudáveis que o consumo de bagel com 68g de brotos de brócolis, importante fonte de sulforafano, inibiu a atividade de HDAC em células sanguíneas mononucleares periféricas após 3 horas, com o retorno da atividade da HDAC em 24h após a ingestão⁵⁰. Assim, o sulforafano pode fazer parte de estratégias quimiopreventivas contra o câncer que podem preconizar, inclusive, a incorporação de determinados alimentos para indivíduos com elevado risco de desenvolvimento de neoplasias.

Compostos do alho, modificações em histonas e quimioprevenção do câncer

Diversos compostos presentes no alho e em hortaliças do gênero *Allium*, como alicina, S-alil cisteína, S-alil mercaptocisteína, sulfeto de

dialila, dissulfeto de dialila e trissulfeto de dialila, são considerados CBAs relacionados com a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis²². Estes compostos apresentam atividade quimiopreventiva contra diversos tipos de câncer. Um dos metabólitos dos compostos sulfurados, o alil mercaptano foi identificado como um inibidor de HDAC, e sugere-se que esse composto possa estar relacionado com as atividades antineoplásicas do alho²².

Modulação da expressão de miRNAs por CBAs no HCC

Diversos estudos sugerem que miRNAs possam ser responsáveis por outro mecanismo de regulação epigenética da expressão gênica. MiRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificante constituídas por uma sequência de 16 a 29 nucleotídeos e que atuam como reguladores negativos de genes em nível pós-transcricional. MiRNAs podem se ligar em sequências complementares não traduzidas de miRNAs e, desta forma, regular a expressão de genes-alvos. Mudanças na expressão de miRNAs estão relacionadas com diversas neoplasias, uma vez que foram identificados diversos miRNAs que potencialmente têm como alvos genes relacionados com a diferenciação e proliferação celular, além da apoptose⁶⁰.

Doadores de grupos metila, expressão de miRNAs e quimioprevenção do câncer

Além de modular a metilação e a estabilidade cromossômica por alterações em histonas, doadores de grupos metila parecem modular a expressão de miRNAs na carcinogênese. Experimentos com roedores tratados com dietas deficientes de doadores de grupos metila demonstraram redução da expressão de um tipo de miRNA, denominado miR-122. A redução da expressão do miR-122 foi observada em lesões pré-neoplásicas e neoplasias hepáticas.⁶⁰

Outros CBAs, expressão de miRNAs e quimioprevenção do câncer

EGCG pode modificar a expressão de diversos miRNAs em células de HCC humanas⁷⁵. CBAs como genisteína, resveratrol, curcumina e selênio, entre outros, parecem também apresentar ações na carcinogênese envolvendo a modulação de miRNAs. Sugere-se também que o derivado isoprênico β -ionona pode modular a expressão de miRNAs em lesões pré-neoplásicas hepáticas de ratos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos CBAs apresentam atividade quimiopreventiva contra vários tipos de neoplasias, inclusive o HCC. A atividade quimiopreventiva envolve mecanismos relacionados com a inibição da proliferação celular e indução da apoptose e diferenciação. As vias moleculares relacionadas com esses processos podem ser controladas geneticamente ou, ainda, apresentar regulação epigenética.

Nesse sentido, há interesse no desenvolvimento de estratégias que combinem agentes quimiopreventivos com diferentes mecanismos de ação que atuem simultaneamente em múltiplas vias envolvidas na carcinogênese²¹. Assim, CBAs que modifiquem o padrão de metilação do DNA poderiam ser associados com outros que alterem a estrutura da cromatina. Uma vez que a restauração da expressão de genes supressores de tumor pela EGCG pode constituir um importante mecanismo antineoplásico, foi sugerida a associação desse CBA com outros potenciais agentes quimiopreventivos, como o ácido butírico. Este, por sua vez, vem sendo preconizado para uso em associação com análogos da vitamina A, como ácido retinoico todo *trans*. Essa associação inibiu o crescimento de células de câncer de mama MCF-7 e restaurou a expres-

são de $RAR\beta$.²⁶ A tributirina também já foi utilizada em associação em modelos de hepatocarcinogênese *in vivo*. Assim, animais tratados com associação da tributirina com a vitamina A e submetidos a modelo de hepatocarcinogênese apresentaram inibição do crescimento de lesões pré-neoplásicas, aumento nos níveis da H3K9ac e aumento da expressão do p21^{cip1/waf1}.²

Aspectos a respeito da biodisponibilidade de CBAs são essenciais para aplicação destes compostos como agentes quimiopreventivos do câncer. Além disso, a partir do momento que os mecanismos de ação de agentes quimiopreventivos forem elucidados, pode-se aventar para o futuro o conceito de quimioprevenção personalizada. Assim, indivíduos que apresentam elevado risco de desenvolvimento de neoplasias poderiam ser submetidos a estratégias de prevenção com determinados CBAs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amir H, et al. Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin D3 cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells. *Nutr. Cancer.* 1999;33:105-12.
2. Andrade FO, et al. Efficacy of the dietary histone deacetylase inhibitor butyrate alone or in combination with vitamin A against proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. *Braz J. Med. Biol. Res.* 2012;45:841-50.
3. Bertram JS, Vine AL. Cancer prevention by retinoids and carotenoids: independent action on a common target. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005;1740:170-8.
4. Bishayee A, et al. Further evidence for chemopreventive potential of β -carotene against experimental carcinogenesis: diethylnitrosamine-initiated and phenobarbitalpromoted hepatocarcinogenesis is prevented more effectively by β -carotene than by retinoic acid. *Nutr. Cancer.* 2000;37:89-98.
5. Blot WJ, et al. Nutrition Intervention Trials in Linxian, China: Supplementation With Specific Vitamin/Mineral Combinations, Cancer Incidence, and Disease-Specific Mortality in the General Population. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993;85:1483-91.
6. Blum A, et al. The beneficial effects of tomatoes. *Eur. J. Intern. Med.* 2005;16:402-4.
7. Cai XZ, et al. Curcumin suppresses proliferation and invasion in human gastric cancer cells by downregulation of PAK1 activity and cyclin D1 expression. *Cancer Biol. Ther.* 2009;8:1360-8.

8. Calvisi DF, et al. Altered methionine metabolism and global DNA methylation in liver cancer: relationship with genomic instability and prognosis. *Int. J. Cancer*. 2007;121:2410-20.
9. Chagas CE, et al. Folic acid supplementation during early hepatocarcinogenesis: cellular and molecular effects. *Int. J. Cancer*. 2011;129:2073-82.
10. Chuang SE, et al. Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2000;38:991-5.
11. Dagli MLZ, et al. β -Carotene reduces the ductular (oval) cell reaction in the liver of Wistar rats submitted to the resistant hepatocyte model of carcinogenesis. *Pathology*. 1998;30:259-66.
12. Darvesh AS, et al. Curcumin and liver cancer: a review. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012;13:218-28.
13. Darvesh AS, Bishayee A. Selenium in the prevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2010;10:338-45.
14. Davie JR. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J. Nutr.* 2003;133 (7 Suppl): 2485S-93S.
15. Davis CD, et al. Dietary selenium and arsenic affect DNA methylation in vitro in Caco-2 cells and in vivo in rat liver and colon. *J. Nutr.* 2000;130:2903-9.
16. De Almeida Vasconcelos Fonseca EM, et al. All-trans and 9-cis retinoic acids, retinol and β -carotene chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve distinct actions on glutathione S-transferase positive preneoplastic lesions remodeling and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2004;26:1940-6.
17. De Conti A, et al. The chemopreventive activity of the butyric acid prodrug tributyrin in experimental rat hepatocarcinogenesis is associated with p53 acetylation and activation of the p53 apoptotic signaling pathway. *Carcinogenesis*. 2013;34:1900-6.
18. De Miranda JX, et al. Effects of selenium compounds on proliferation and epigenetic marks of breast cancer cells. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2014;28:486-91.
19. Devereux TR, et al. Mutation and altered expression of the human cancer genes: what they tell us about causes. *Iarc Sci. Publ.* 1999;146:19-42.
20. Dipple A. DNA adducts of chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1995;16:437-41.
21. Doll R. The lessons of life: Keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Res.* 1992;52:2024s-9s.
22. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 1981;66:1191-308.
23. Dong Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutat Res.* 2003;523-524:145-50.
24. Eden A, et al. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*. 2003;300:455.
25. Esteller M, et al. Hypermethylation-associated inactivation of the Cellular Retinol-Binding-Protein 1 Gene in Human Cancer. *Cancer Res.* 2002;62:5902-5.
26. Fang MZ, et al. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res.* 2003;63:7563-70.
27. Farber E, Rubin H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. *Cancer Res.* 1991;51:2751-61.
28. Gerhauser C. Cancer chemoprevention and nutriepigenetics: state of the art and future challenges. *Top Curr. Chem.* 2013;329:73-132.
29. Giovannucci E, et al. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995;87:1767-76.
30. Gradelet S, et al. Modulation of aflatoxin B1 carcinogenicity, genotoxicity and metabolism in rat liver by dietary carotenoids: evidence for a protective effect of CYP1a inducers. *Cancer Lett.* 1997;114:221-3.
31. Guest I, et al. Age dependence of oval cell responses and bile duct carcinomas in male Fischer 344 rats fed a cyclic choline-deficient, methionine-supplemented diet. *Hepatology*. 2010;52:1750-7.
32. He Y, et al. Effects of carotenoid-rich food extracts on the development of preneoplastic lesions in rat liver and on in vivo and in vitro antioxidant status. *Nutr. Cancer*. 1997;27:238-44.
33. Heidor R, et al. Anticarcinogenic actions of tributyrin, a butyric acid prodrug. *Curr. Drug Targets*. 2012;14:1720-9.
34. Hixson DC, et al. Antigenic phenotypes common to rat oval cells, primary hepatocellular carcinomas and developing bile ducts. *Carcinogenesis*. 1997;18:1169-75.
35. Hong WK, Sporn MB. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science*. 1997;278:1073-7.
36. Jiang, et al. Epigenetics and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2004;5:479-510.
37. Júnior AA, et al. A comparison of β -carotene and vitamin A effects on a hepatocarcinogenesis model. *Int. J. Vitam. Nutr.* 1995;65:87-94.
38. Kuttan G, et al. Antitumor, anti-invasion, and antimetastatic effects of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007;595:173-84.
39. Lenzi M, et al. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Cancer Treat. Res.* 2014;159:207-23.
40. Leong H, et al. Green tea catechins inhibit angiogenesis through suppression of STAT3 activation. *Breast Cancer Res. Treat.* 2009;117:505-15.
41. Liu BL, et al. New enlightenment of French Paradox: resveratrol's potential for cancer chemoprevention and anti-cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* 2007;6:1833-6.
42. Liu M, Jiang L, Guan XY. The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: a recent update. *Protein Cell.* 2014;5:673-91.
43. Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J. Hepatol.* 2008;48:S20-S37.
44. Lu YP, et al. Topical applications of caffeine or (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002;99:12455-60.

45. Miller MC, et al. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol. Lett.* 2001;120:269-80.
46. Moreno FS, et al. A comparison of β -carotene and vitamin A effects on a hepatocarcinogenesis model. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1995;65:87-94.
47. Moreno FS, et al. Effect of beta-carotene on the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. *Cancer Lett.* 1995;96:201-8.
48. Moreno FS, et al. Inhibitory effects of β -carotene and vitamin A during the progression phase of hepatocarcinogenesis involve inhibition of cell proliferation but not alterations in DNA methylation. *Nutr. Cancer.* 2002;44:80-8.
49. Moreno FS, et al. Inhibitory effects of β -carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. *Carcinogenesis.* 1991;12:1817-22.
50. Myzak MC, et al. Sulforaphane retards the growth of human PC-3 xenografts and inhibits HDAC activity in human subjects. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2007;232:227-34.
51. Naves MM, et al. Effects of β -carotene and vitamin A on oval cell proliferation and connexin 43 expression during hepatic differentiation in the rat. *J. Nutr. Biochem.* 2001;12:685-92.
52. Naves MMV, Moreno FS. β -Carotene and cancer chemoprevention: from epidemiological associations to cellular mechanisms of action. *Nutr. Res.* 1998;18:1807-24.
53. Notarbartolo M, et al. Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF-kB activation levels and in IAP gene expression. *Cancer Lett.* 2005;224:53-65.
54. Ong TP, et al. Chemoprevention of hepatocarcinogenesis with dietary isoprenic derivatives: cellular and molecular aspects. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2012;12:1173-90.
55. Ong TP, et al. Targeting the epigenome with bioactive food components for cancer prevention. *J. Nutrigenet Nutrigenomics.* 2011;4:275-92.
56. Ott M, et al. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007;12:913-22.
57. Pitot HC. Pathway of progression in hepatocarcinogenesis. *Lancet.* 2001;358:859-60.
58. Pitot HC, Dragan YP. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *Faseb J.* 1991;5:2280-6.
59. Pogribny IP, et al. Molecular alterations in hepatocarcinogenesis induced by dietary methyl deficiency. *Mol. Nutr. Food Res.* 2012;56:116-25.
60. Pogribny IP, Rusyn I. Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2014;342:223-30.
61. Rao AV, et al. Lycopene. *Adv. Food Nutr. Res.* 2006; 51:99-164.
62. Raynaud CM, et al. Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2008;66:99-117.
63. Rizzi MB, et al. β -Carotene inhibits persistent and stimulates remodeling gamma-GT positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1997;67:415-22.
64. Rogiers V. Biology and pathobiology of gap junctional channels in hepatocytes. *Hepatology.* 2008;47:1077-88.
65. Rowling MJ, et al. Vitamin A and its derivatives induce hepatic glycine N-methyltransferase and hypomethylation of DNA in rats. *J. Nutr.* 2002;123:365-9.
66. Rühl R, et al. Carotenoids and their metabolites are naturally occurring activators of gene expression via the pregnane X receptor. *Eur. J. Nutr.* 2004;43:336-43.
67. Sadek IA, Hayat LG. Initiation and post-initiation chemopreventive effects of β -carotene in toad liver carcinogenesis. *Histol. Histopathol.* 1996;11:357-60.
68. Sampaio AR, et al. Vitamin A and β -carotene inhibitory effect during 1, 2-dimethylhydrazine induced hepatocarcinogenesis potentiated by 5-azacytidine. *Food Chem. Toxicol.* 2007;45:563-7.
69. Sarkar A, et al. Inhibition of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene-induced hepatocarcinogenesis in rat by dietary beta-carotene: changes in hepatic anti-oxidant defense enzyme levels. *Int. J. Cancer.* 1995;61:799-805.
70. Sarkar A, et al. Inhibitory effect of β -carotene on 2-acetylaminofluorene-induced hepatocarcinogenesis in rat: reflection in hepatic drug metabolism. *Carcinogenesis.* 1994;15:1055-60.
71. Sarkar A, et al. β -Carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in experimental hepatocarcinogenesis. *Cancer Biochem. Biophys.* 1995;15:111-25.
72. Sercu S, et al. The extracellular matrix protein 1: its molecular interaction and implication in tumor progression. *Cancer Invest.* 2008;26:375-84.
73. Shukla S, et al. Epigenetic regulation by selected dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Cancer Lett.* 2014;355:9-17.
74. Srivastava RK, et al. Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21/(WAF1/CIP1). *Cell Cycle.* 2007;6:2953-61.
75. Supic G, et al. Epigenetics: a new link between nutrition and cancer. *Nutr. Cancer.* 2013;65:781-92.
76. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer.* 2003;3:768-80.
77. Tamura K, et al. Inhibition by N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and all-trans-retinoic acid of exogenous and endogenous development of putative preneoplastic, glutathione S-transferase placental form-positive lesions in the livers of rats. *Carcinogenesis.* 1997;18:2133-44.
78. Tanaka T, et al. Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules.* 2012;17:3202-42.
79. Tannenbaum, A. Relationship of body weight to cancer incidence. *Arch. Path.* 1940;30:509-17.
80. Thorgerirsson SS. Hepatic stem cells in liver regeneration. *Faseb J.* 1996;10:1249-56.
81. Trosko JE. Gap junctional intercellular communication as a biological "Rosetta stone" in understanding, in a systems biological manner, stem cell behavior, mechanisms of epigenetic toxicology, chemoprevention and chemotherapy. *J. Membr. Biol.* 2007;218:93-100.

82. Tryndyak VP, et al. Coupling global methylation and gene expression profiles reveal key pathophysiological events in liver injury induced by a methyl-deficient diet. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011;55:411-8.
83. Tsuda H, et al. Chemopreventive effects of β -carotene, α -tocopherol and five naturally occurring antioxidant-initiation of hepatocarcinogenesis by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the rat. *Jpn. J. Cancer Res.* 1994;85:1214-9.
84. Vance TM, et al. Dietary antioxidants and prostate cancer: a review. *Nutr. Cancer.* 2013;65:793-801.
85. Vanden Berghe W. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: lifelong remodeling of our epigenomes. *Pharmacol.* 2012;65:565-76.
86. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993;9:138-41.
87. Wainfan E, Poirier LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res.* 1992;52 (Suppl. 7): 2071s-77s.
88. Wang HG. Anticancer effects of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Int. J. Mol. Med.* 2013;31:967-74.
89. Wójcik M, et al. Effect of carotenoids on in vitro proliferation and differentiation of oval cells during neoplastic and non-neoplastic liver injuries in rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008;59:203-13.
90. World Cancer Research Foundation/American Institute For Cancer Research. Patterns of cancer. In: *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective.* 1997;35-52.
91. Wynder EL, Gori GB. Contribution of the environment to cancer incidence: an epidemiologic exercise. *J. Natl. Cancer Inst.* 1977;58:825-32.
92. Wynder EL, Shigematsu T. Environmental factors of cancer of the colon and rectum. *Cancer.* 1967;20:1520-61.
93. Yang CS, et al. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002;42:25-54.
94. Yao H, et al. Dietary flavonoids as cancer prevention agents. *J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 2011; 29:1-31.
95. Yu MW, et al. Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection. *Am. J. Epidemiol.* 1999;150:367-74.
96. Yuan JM, et al. Prediagnostic level of serum retinol in relation to reduced risk of hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006;98:482-90.
97. Zhang M, Thorgeirsson SS. Modulation of connexins during differentiation of oval cells into hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 1994;213:37-42.