UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Efeito protetor de carotenóides em poperoxidação, danos oxidativos em DNA e lesões histológicas induzidas por ferro

HUMBERTO REIS MATOS

Tese de Doutoramento apresentada ao
Departamento de Bioquímica

Profa. Dra. MARISA HELENA GENNARI DE MEDEIROS
Orientadora

São Paulo
2001

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

Matos, Humberto Reis
M433e Efeito protetor de carotenóides em lipoperoxidação, danos oxidativos em DNA e lesões histológicas induzidas por ferro / Humberto Reis Matos. -- São Paulo, 2001.
151p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Medeiros, Marisa Helena Gennari de

1. Radical livre : Bioquímica teórica I. T. II. Medeiros, Marisa Helena Gennari de, orientador.

574.19282 CDD

"Efeito Protetor de Carotenóides em Lipoperoxidação, Danos Oxidativos em DNA e Lesões Histológicas Induzidas por Ferro"

HUMBERTO REIS MATOS

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Profa. Dra. MARISA HELENA GENNARI DE MEDEIROS
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. RUI CURI
ICB – USP

Profa. Dra. ANA CAMPA
FCF – USP

Profa. Dra. ANA LÚCIA TABET OLLER DO NASCIMENTO
IB

Profa. Dra. ELIZABETH ANGÉLICA LEME MARTINS
IB

SÃO PAULO
25 DE OUTUBRO 2001.

Fez-se... caminhou... sonhou muito, bem sei; riu, chorou e pouco viveu... Mas ensinou-me a viver – Trago de ti teu belo, também sonho; como nos teus sonhos... desfaço-me em ti... **Maria Conceição Reis...** nossos ventos são tíbios, leves...

A Carlos Francisco de Matos, pelo seu brilho e juventude... alegria, tanto ânimo... tanta vida... sempre estiveram comigo.

À Paulina... pelas tantas cores... brilhos... vida.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marisa H. G. Medeiros pela orientação, confiança, amizade e pela liberdade de poder trabalhar. E sem dúvida por sempre estar disposta a ajudar, mesmo que seja aos 48 minutos do segundo tempo, como só ela diz, com alegria, bom humor e disposição, valeu!!!

À Dra. Vera Luiza Capellozi que me acolheu num momento importante do trabalho. Cheia de paciência e disposição me inseriu no mundo da histopatologia.

Ao Dr. Paolo Di Mascio pela colaboração.

Ao Dr. Etelvino Bechara pelas sugestões sempre pertinentes

Ao meu grande camarada Osmar Francisco Gomes, companheiro de bancada e de muitas conversas, aprendi muito com você!

Ao amigo Valdemir Melechco de Carvalho, por sempre me apoiar, e ajudar com nossas conversas ao longo das noites de trabalho; nunca soube me dizer não.

A meu querido amigo Alexandre Alves, Alexeie, pela convivência e amizade.

A Frederico e a Jô pelo prazer que tive em conhecê-los.

À Dra Teresa Miranda pela oportunidade, sempre rica, de participar por duas vezes com seu monitor no PAE.

A querida amiga Lia Nakoa pela amizade ao longo destes anos.

Aos amigos: Marcos Paulo, Ribamar, Telma, Eduardo, Clécio e seu bom humor fino e saudável, Flávio, Célio Xavier, Patrícia.

Aos colegas do Laboratório do Paolo: Priscila, Janice, Lídia, Glaucia, Cristiane, Sayuri.

Ao meu grande amigo Marcelo Lima Azevedo por sempre me apoiar em muitos momentos, eis uma amizade solidificada aos longos do anos.

A Ana Paula Loureiro por sua postura sempre discreta e tranqüila.

A Sabrina Marques pela colaboração em muitos experimentos.

Um agradecimento especial para toda a galera da Bahia que sempre estiveram presentes cheios de axé: Marcos Machado, Antonio Souza (Barbosa) Franklin Carvalho, Murilo Muniz, Alexandre Souza, Camila, Gabriel, Ivan nascimento, Robinson Magalhães, Glauber Brito, Altamiro Xavier, Newman, Glauber Carvalho

Aos colegas da Secretária de Pós-graduação por sempre estarem dispostos a me ajudarem com presteza: Milton, Inês, Cibele, Emiliano.

A todo o pessoal do laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da USP pela ajuda e disposição na confecção das lâminas: Vera, Roseli e tantos outros.

A Rose e Melissa pelas boas conversas.

A todo o pessoal da secretária do Departamento de Bioquímica: Cintia, Laura, Simone, Fábio e Viviane.

A Carlos, Marcio e Joana do Serviço de documentação Científica da Faculdade de Medicina.

A Chiquinho e Jajá do serviço de xerox do Instituto de Química.

Aos amigos do 305 A (Crusp) Nilton, Ricardo, Klaus e Filipe, Fábio por terem me acolhido na minha chegada a São Paulo.

Ao amigo Edson de Jah, pessoa que se aprende a gostar sem muitas delongas.

A todas as grandes figuras que conheci morando no CRUSP: Edison (violeiro), Falcão, Luiz Fulano de Tal, Robson.... Sandro Valeriano, Jadir, Mineiro, Santista, Digão, Mirandinha, Edmilson, Rodrigo, Zé Raimundo, Wellington, Luciano deles... tenho as melhores lembranças, sempre!

À Dra. Ana Campa pela simpatia, alegria.

Ao Dr. Rui Curi pela belas aulas no curso de pós-gradução.

Aos colegas do biotério: Mônica, Cristina, Dona Matilde, Vagner, Eliane, por ter me ajudo ao longos dos anos de trabalho

Aos colegas da biblioteca: Chiquinho, Angelo, Marcia e Eliane.

Ora, o que seria a vida sem vocês...

APOIO FINANCEIRO

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

USP/COFECUB/UC-23/96 e UC/98 – Universidade de São Paulo/Comité Français d´Evaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil

PRONEX/FINEP – Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência

PADCT – Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Pró-Reitoria de Pesquisa – Universidade de São Paulo

Agradecimento especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto de pesquisa.

ÍNDICE

ABREVIAÇÕES.....7
RESUMO.....9
ABSTRACT.....11
1.0 –
INTRODUÇÃO.....13
1.1. Propriedades químicas e estruturais dos carotenóides.....13
1.2. Carotenóides como antioxidantes..... 16
1.3. Fontes de licopeno e β-caroteno.....20
1.4. Cinética, absorção, transporte e metabolismo.....23
1.5. Distribuição de carotenóides em tecidos.....29
1.6. Complexo Fe-NTA (ácido nitrilotriacético de ferro III).....32
1.7 A lipoperoxidação.....38
1.8. Danos em DNA.....41
1.8.1. Lesões promovidas por espécies reativas do oxigênio.....41
1.8.2. Radical hidroxila.....42
1.8.3. Oxigênio singlete.....44
1.9. Carotenóides na prevenção de doenças 48
1.9.1 Licopeno, β-caroteno e câncer.....48
2.0–
OBJETIVOS.....52
3.0 - MATERIAIS E MÉTODOS.....53
3.1. Reagentes.....53
3.2. Equipamentos.....54
3.3. Cultivo das células.....55
3.4. Tratamento das células.....56
3.4.1. Solução estoque de licopeno.....56
3.4.2. Tratamento e absorção de licopeno pelas células.....56
3.4.3. Nitrilotriacetato de ferro (Fe-NTA).....58
3.5. Determinação da lipoperoxidação (ácido tiobarbitúrico).....59
3.6. Viabilidade celular.....60

3.7. Dosagem de sulfidrilas não-protéicas (NPSH).....61
3.8. Dosagem de proteínas (método de Bradford).....62
3.9. Tratamento dos ratos com solução de Fe-NTA.....64
3.10. Administração de carotenóides.....64
3.11. Isolamento do DNA.....65
3.12. Hidrólise enzimática.....67
3.13. Análise de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dGuo) por HPLC por detecção eletroquímica.....66
3.14. Determinação do malonaldeído com indicador de lipoperoxidação.....67
3.15. Extração de carotenóides dos órgãos.....68
3.16. Procedimento histológico.....69
3.17. Biodisponibilidade do β-caroteno e do licopeno.....70
3.17.1. Canulação dos ratos.....70
3.17.2. Outro método para coleta de sangue dos ratos.....71
3.17.3. Preparo das amostras de sangue.....71
3.17.4. Separação de linfócitos.....72
4.0 – RESULTADOS.....73
4.1. Efeito de licopeno em células em cultura.....73
4.1.1. Nível de licopeno em células.....73
4.1.2. Relação entre formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e sulfidrilas não-proteícas em células tratadas com Fe-NTA.....73
4.1.3. Redução da formação de 8-oxodGuo em DNA de células por licopeno.....74
4.2. Efeito de carotenóides em tecidos de ratos.....75
4.2.1. Concentração de licopeno e β-caroteno em fígado de rato.....75
4.2.2. Concentração de MDA em fígado de ratos Wistar tratados com Fe- NTA.....76
4.2.3. Redução da formação de 8-oxodGuo em DNA de fígado de rato por licopeno ou β-caroteno.....76
4.2.4. Alterações histológicas no fígado.....77
4.2.5. Concentração de licopeno e β-caroteno em rim de rato.....78
4.2.6. Concentração de MDA em rim de ratos tratados com

Fe-NTA.....79
4.2.7. Redução da formação de 8-oxodGuo em DNA de rim de rato por licopeno ou β-caroteno.....80
4.2.8. Alterações histológicas no rim.....80
4.2.9. Concentração de licopeno e β-caroteno em pulmão de rato.....82
4.2.10. Concentração de MDA em pulmão de rato Wistar tratado Fe-NTA.....83
4.2.11. Redução da formação de 8-oxodGuo em DNA pulmão de rato por licopeno ou β-caroteno.....83
4.2.12. Concentração de licopeno e β-caroteno em próstata de rato.....84
4.2.13. Concetração de MDA em próstata de rato tratado com Fe-NTA.....85
4.2.14. Redução da formação de 8-oxodGuo em DNA de próstata de rato por licopeno ou β-caroteno..... 86
4.2.15. Redução da formação de 8-oxodGuo em DNA de linfócitos de rato por licopeno ou β-caroteno.....87
5.0 - DISCUSSÃO.....114
6.0 - CONCLUSÃO.....128
7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....130

ABREVIAÇÕES

$^1\Delta_gO_2$	Oxigênio singlete
$^3\Sigma_gO_2$	Oxigênio no estado fundamental
5-OHCyt	5-hidroxicitosina
5-OHdCyd	5-hidroxi-2´-desoxicitidina
5-OHdUrd	5-hidroxi-2´-desoxiuridina
5-OHUra	5-hidroxiuracila
8-HETE	Ácido 8-hidroxieicosatetraenóico
8-oxodA	8-oxo-7,8-dihidro-2´-desoxiadenosina
8-oxodGuo	8-oxo-7,8-dihidro-2´-desoxiguanosina
12-HETE	Ácido 12-hidroxieicosatetraenóico
Abs	Absorbância
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AP	Apurínicos/apirimidínicos, abásicos
ATPase	Adenosina 5´-trifosfatase
BHT	Hidroxitolueno butilado
Car	Carotenóides
CHO	Células de ovário de hamster chinês
CoA	Coenzima A
CV1-P	Fibroblastos renais de macaco verde africano
CYP	Citocromo P450
dA	2´-Desoxiadenosina
Da	Daltons
DAN	2,3-Diaminonaftaleno
DDE	*trans,trans*-2,4-Decadienal
dG	2´-Desoxiguanina
dGTP	2´-Desoxiguanosina 5´-trifosfato
dGuo	2´-Desoxiguanosina
DI	Diâmetro interno
DMBA	Dimetilbenzantraceno
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
dNTP	desoxinucleotídeotrifosfato
DSS	3 – Trimetil -1- propanossulfonato de sódio
DTNB	bis(3-carboxi-4-nitrofenil)dissulfeto(ditionitrobenzoato)
DTPA	Ácido dietilenetriaminopentaacético
EC	Eletroquímico
EDTA	Ácido etilenediaminotetraacético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
Fapy	Formamidopiridina
FapyGua	2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopiridina
Fe-NTA	Nitrilotriacetato de ferro
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
Fpg	Formamidopirimidina DNA *N*-glicosilase
GC	Cromatografia gasosa
GMP	Guanosina 5´-monofosfato
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HEL	Linhagem celular de eritroleucemia humana
HHE	4-Hidroxi-2-hexenal
His	Histidina
HNE	*trans*-4-Hidroxi-2-nonenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance

IGF-1	Fator de crescimento do tipo insulina 1
IL	Interleucina
LC	Cromatografia líquida
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Ácido graxo poliinsaturado
$L^{\bullet}$	Radical lipídico centrado no carbono
$LOO^{\bullet}$	Radical peroxila
LOOH	Hidroperóxido lipídico
MDA	Malonaldeído
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5- difenil-2H-tetrazólio
NAD^{+}	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NAT	*N*-acetiltransferase
NGF	Fator de crescimento de nervos
NPSH	Sulfidrilas não-proteicas
PBS	Tampão fosfato salina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PMA	Acetato de forbol miristato
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
$RO^{\bullet}$	Radical alcoxila
$RO_2^{\bullet}$	Radical peroxila
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SH	Tiol
$SQ^{\bullet-}$	Semiquinona
$RS^{\bullet}$	Radical tiila
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TGF-β	Fator de crescimento de transformação β
THF	Tetrahidrofurano
TIC	Corrente iônica total
TMS	Tetrametilsilano
TPA	12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UA	Unidades arbitrárias
UV	Ultravioleta

RESUMO

Evidências experimentais e epidemiológicas sugerem que o licopeno e o β-caroteno, presentes em tomates, produtos de tomates, muitas frutas e vegetais, podem prevenir certos tipos de câncer em seres humanos. Entretanto, para estabelecer firmemente as relações do licopeno com a prevenção de doenças, maiores informações sobre os possíveis mecanismos bioquímicos associados a esses processos são necessárias. Com este intuito, investigamos o efeito do licopeno em células de mamífero e em ratos submetidos a excesso de ferro, sistema conhecido por promover o estresse oxidativo gerando lesões em biomoléculas.

Inicialmente investigamos o efeito protetor do licopeno em lipoperoxidação e danos oxidativos em DNA de células de rim de macaco verde africano (linhagem CV1-P) expostas ao tratamento com nitrilotriacetato de ferro (Fe-NTA)/ascorbato. Constatamos que as células pré-tratadas com licopeno e submetidas ao tratamento com Fe-NTA/ascorbato mostram uma redução de 86% na lipoperoxidação e redução em 77% na formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2´-desoxiguanosina (8-oxodGuo), quando comparadas com as células tratadas apenas com Fe-NTA/ascorbato. Considerando esses resultados, resolvemos seguir nossos estudos, *in vivo*, verificando se o pré-tratamento com licopeno e β-caroteno protegeria ratos *Wistar,* submetidos a tratamento com injeção intraperitonial de Fe-NTA, da lipoperoxidação, de danos oxidativos em DNA e de mudanças histopatológicas em fígado, rim, próstata e linfócitos. Comparados com os tecidos de ratos do grupo controle, o fígado, o rim, o

pulmão, a próstata e os linfócitos de ratos tratados com Fe-NTA mostraram um aumento de 2-5 vezes na concentração de 8-oxodGuo e um aumento de 40-75% na concentração de malonaldeído (MDA). Concomitantes mudanças histopatológicas no rim e no fígado (necrose e esteatose) foram também observadas. Com o pré-tratamento por cinco dias consecutivos com licopeno ou β-caroteno (10 mg/kg de massa corpórea, *i.p*), observamos completa prevenção dos danos oxidativos em DNA, da lipoperoxidação e das alterações histológicas nos tecidos estudados.

Diversos estudos *in vitro* têm demonstrado a habilidade desses carotenóides em seqüestrar radicais peroxila e suprimir oxigênio singlete. O presente trabalho indica que essa ação antioxidante ocorre também em células e *in vivo,* através da proteção de lesões oxidativas em biomoléculas e danos em tecidos induzidos por ferro. Os dados apresentados contribuem para o esclarecimento da ação biológica dos carotenóides em organismos submetidos a sistemas que induzem o estresse oxidativo e suportam um dos possíveis mecanismos responsáveis pelo potencial anticâncer de carotenóides observados em estudos epidemiológicos.

ABSTRACT

Experimental and epidemiological evidences suggest that lycopene and β-carotene, carotenoids present in tomatoes, tomato products and several fruits and vegetables may play a role in preventing certain cancers in humans. However, to establish their role in health, more information is required to identify the biochemical mechanisms associated with these processes. With the aim of producing such information, we have first investigated the effect of lycopene on lipid peroxidation and on the formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) in CV1-P monkey cells exposed to ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) plus ascorbate. Cells supplemented with lycopene (20 fmol/10^6 cells) showed an approximate reduction of 80% in Fe-NTA/ascorbate-induced lipid peroxidation (TBARS). Levels of 8-oxodGuo in the cells increased over tenfold after treatment with Fe-NTA/ascorbate as compared to the control group. Lycopene supplementation decreased 8-oxodGuo in Fe-NTA/ascorbate-treated cells to approximately 70%.

In order to verify if these effects are also operative *in vivo*, we have investigated the effect of lycopene and β-carotene pre-treatment on lipid peroxidation, oxidative damage to DNA and histopathological changes in liver, kidney, lung, prostate and lymphocytes of animals subjected to i.p. ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) administration. Compared with control rats, liver of Fe-NTA treated animals showed a 2-5 fold increase in 8-oxodGuo level and 40-75 % increase in malodialdehyde (MDA) accumulation concomitant with tissue histopathological changes. Five days of lycopene

and β-carotene pre-treatment (10 mg/kg body weight, i.p.) almost completely prevented liver biomolecule oxidative damage and protected the tissue against the observed histological alterations.

In conclusion, it is shown that lycopene and β-carotene prevented oxidative damage to DNA, membranes and markedly reduced the histological changes induced by Fe-NTA. Inhibition of these oxidative processes by carotenoids is likely due to their ability to trap peroxyl radical and to quench singlet oxygen. The results described herein may contribute toward a better understanding of the biological mechanisms associated with the potential cancer-preventing property of carotenoids observed in epidemiological studies.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Propriedades químicas e estruturais dos carotenóides

Os carotenóides são uma classe de mais de 600 pigmentos naturais lipofílicos presentes em frutas, vegetais e alguns microorganismos (Stahl e col., 1996). A cor e a atividade antioxidante são conseqüências de sua estrutura única, um sistema de duplas ligações conjugadas. Os carotenóides são tetraterpenos formados pela ligação de duas unidades de C-20 e em muitos carotenóides o grupamento final é modificado em anéis de 5 e 6 membros, gerando compostos monociclos e diciclos. Com base na sua composição os carotenóides são subdivididos em dois grupos. Aqueles que contêm apenas átomos de carbono e hidrogênio são designados carotenos. Entretanto, a maioria dos carotenóides naturais contém pelo menos um átomo de oxigênio compondo grupos ceto-, hidroxi- ou epóxi-carotenóides. A presença de oxigênio nos carotenóides gera um grupo chamado de xantofilas, por exemplo, luteína e cantaxantinas (Straub,1987, van der Berg e col., 2000) **(Figura 1)**.

Em princípio, cada cadeia poliênica de duplas ligações pode existir na conformação *cis* ou *trans,* criando um enorme número de isômeros geométricos. Entretanto, devido a restrições estéricas, poucos isômeros são formados em quantidades apreciáveis. Nos organismos humanos a distribuição de isômeros varia entre os carotenóides, e diferentes distribuições são encontradas nos diversos compartimentos do corpo.

As cores características relativas à absorção de luz dos carotenóides na região de 400 a 500 nm do espectro de luz ocorrem devido à presença de duplas ligações conjugadas nessas moléculas. O

licopeno e β-caroteno apresentam apenas duplas ligações carbono-carbono, mas em algumas outras moléculas, como as cantaxantinas, duas duplas ligações carbono-oxigênio se estendem da cadeia poliênica do cromóforo.

A cadeia poliênica rica em elétrons é suscetível ao ataque eletrofílico. Deste modo, agentes oxidantes e radicais livres reagem rapidamente com os carotenóides *in vitro*. De fato, os carotenóides em solução são facilmente degradados em presença de apenas traços de oxigênio, levando-os a ter menos cor, assim que o cromóforo é clivado. Entretanto, *in vivo*, devido a suas propriedades hidrofóbicas, a molécula do carotenóide é muitas vezes estabilizada contra ataques de agentes eletrofílicos por proteínas, especialmente lipoproteínas e lipídios constituintes de proteínas de membranas. Portanto, a instabilidade dos carotenóides em solução não reflete a sua taxa de degradação em célula. Além disso, a orientação do carotenóide dentro da membrana deve influenciar sua suscetibilidade para diferentes ataques de radicais livres. Se a molécula de carotenóide estiver nos limites das áreas hidrofóbicas das membranas, elas só reagirão eficientemente com os radicais que estiverem nas suas proximidades. Em contraste, os grupos funcionais polares das xantofilas, tal como hidroxilas, favorecem maior acessibilidade para as moléculas de água do meio (Britton, 1995).

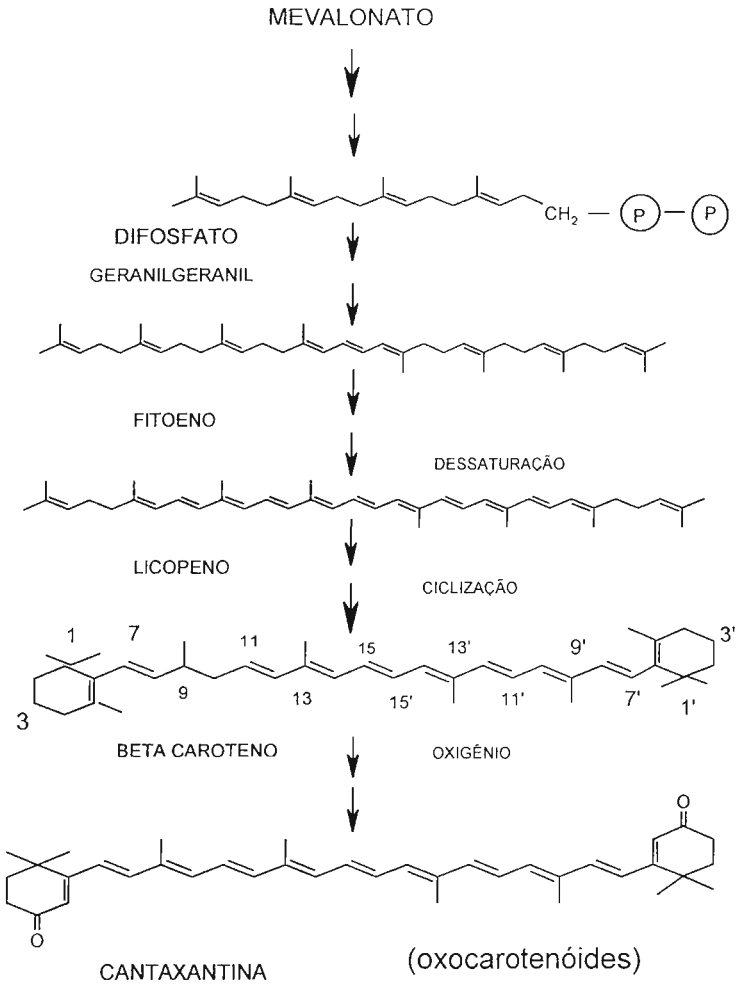

Figura 1 - Esquema da biossíntese de carotenóides, mostrando a posição central do licopeno (Stahl e col., 1996).

1.2 - Carotenóides como antioxidantes

Uma definição geral de antioxidante foi proposta por Halliwell e Gutteridge (1999) como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações relativas aos substratos oxidáveis, pode suprimir, atrasar ou previnir a oxidação destes substratos.

A atividade antioxidante de carotenóides *in vitro* foi bem estabelecida pela descrição de sua propriedade de supressão do $^1O_2$ (Foote e col., 1968) e sua habilidade para seqüestrar radicais peroxilas (Burtun e col., 1984). A supressão do oxigênio singlete por carotenóides ocorre por supressão química e física, vias que têm sido discutidas em detalhe na literatura (Krinsk e col., 1989; Sies e col., 1995). A eficiência da supressão física excede muito a química e envolve transferência de energia do $^1O_2$ para o carotenóide, resultando em oxigênio no estado fundamental e carotenóide excitado no estado triplete. A energia deste estado é dissipada em forma de calor através de interações rotacionais e vibracionais, produzindo carotenóide na forma fundamental (Tachon e col., 1989; Di Mascio e col., 1996; Di Mascio e col., 1989; Krinsky, 1991).

$$^1O_2 + \beta\text{-caroteno} \rightarrow {}^3O_2 + {}^*\beta\text{-caroteno}$$

$$^*\beta\text{-caroteno} \rightarrow \beta\text{-caroteno} + \text{energia (calor)}$$

A constante de supressão de oxigênio singlete por carotenóides está na ordem de 10^9 M^{-1} s^{-1}, isto é, aproxima-se da constante de controle por difusão.

A atividade supressora dos carotenóides depende fundamentalmente do número de ligações duplas conjugadas e, com menor importância, dos grupos terminais (cíclicos ou acíclicos) ou da natureza do substituinte em carotenóides contendo cadeias cíclicas (Hirayama e col., 1994). A supressão química contribui com menos de 0,05% do total da capacidade de supressão dos carotenóides e é responsável pela decomposição final dos carotenóides (Krasnovskii e col., 1983). Alguns dos produtos da decomposição formados da interação do licopeno com o oxigênio singlete têm sido recentemente identificados. A irradiação do licopeno em presença de azul de metileno como sensibilizador e atmosfera de oxigênio induz a formação de 2-metil-2-heptano-6-ona e apo-6-licopenal, bem como outros produtos da reação (Ukai e col., 1994). Especula-se também que a decomposição ocorre via formação de um dioxoetano intermediário nas posições 5-6 das duplas ligações. Os produtos da decomposição podem ter atividades biológicas como está descrito para os apocarotenais formados do β-caroteno, precursor do retinal (Krinsky e col., 1993; Russel e col., 1993). Azul de metileno também foi usado como sensibilizador no estudo do consumo dos carotenóides durante fotooxidação de plasma humano e lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Ojima e col. e Terao, 1993). Em ambos, plasma e LDL, os carotenóides e tocoferois foram consumidos, quando hidroperóxidos de éster colesteril foram acumulados. Licopeno e β-caroteno foram mais resistentes à fotooxidação em plasma do que luteína e zeaxantina. Em contraste, o decréscimo de licopeno foi alto em LDL e plasma, quando o ácido 12-(1-pireno) dodecanóico foi utilizado como

fotossensibilizador. β-Caroteno é um eficiente seqüestrador de radicais peroxilas, especialmente em baixa tensão de oxigênio (Burtun e col., 1984; Kennedy e col., 1991). Este efeito pode ser exibido também com outros carotenóides, incluindo licopeno. A interação de carotenóides com radicais peroxila pode produzir um aduto instável do β-caroteno (Burtun e col., 1984).

A reação de carotenóides (abreviados como Car nas reações abaixo) com radicais de oxigênio pode ocorrer por:

1- transferência de elétrons, como por exemplo:

$CCl_3O_2^{\bullet} + Car \rightarrow Car^{\bullet +} + CCl_3O_2^{-}$

2- reação adição

$Car + RO_2^{\bullet} \rightarrow [Car{-}OOR]^{\bullet}$

Os carotenóides podem também reagir com $HO^{\bullet}$ como doador de átomo de hidrogênio

$HO^{\bullet} + CarH \rightarrow Car^{\bullet} + H_2O$

Os radicais centrados no carbono do $Car^{\bullet}$ são relativamente estáveis devido à delocalização eletrônica o que torna a reação com o oxigênio lenta.

$Car^{\bullet} + O_2 \leftrightarrow CarO_2^{\bullet}$

O $Car^{\bullet}$ pode também adicionar outro radical, por exemplo:

$Car^{\bullet} + RO_2^{\bullet} \rightarrow Car{-}OOR$

gerando um produto não radicalar.

Além das funções como antioxidante é importante ressaltar que os carotenóides desempenham diversos outros papéis nos sistemas biológicos (van den Berg e col. , 2000; Olson e Krinsky, 1995 e Krinsky, 1993). A função mais estudada de carotenóides é a atividade pró-vitamina desempenhada por alguns desses compostos, especialmente o β-caroteno (o α-caroteno e a β-criptoxantina também possuem atividade pró-vitamina A só que menor que a do β-caroteno).

Alguns estudos têm apontado efeitos imunomoduladores, como a redução de imunossupressão induzida por UV (Fuller e col., 1992). É descrita também a capacidade de carotenóides em aumentar a comunicação intercelular, junção "gap" (Rao e Agarwal, 1999). A perda desta comunicação pode ser um fator importante para a transformação maligna e a restauração desta pode reverter o processo maligno (Stahl e Sies, 1998). As principais funções biológicas do licopeno e β-caroteno estão sumarizadas na **Tabela I**.

Tabela I

Propriedades química e bioquímica do licopeno e β-caroteno (Stahl e col., 1996).

	Licopeno	β-caroteno	Referência
Número total de duplas ligações conjugadas	11	9	
Supressão de oxigênio singlete	17×10^9	13×10^9	(1, 2)
Sequetro de radicais (equivalente em Trolox)	2,9	1,9	(3)
Reação de ânions radicais de carotenóides com O_2; k (M^{-1} S^{-1})	2×10^8	25×10^8	(4)
Atividades biológicas			
Indução de junções gap comunicantes	++	++++	(5)
Inibição do crescimento de células quimicamente transformadas (C3H/10T1/2)	+	++++	(6)
Supressão da proliferação celular (MCF-7)	++++	++	(7)
Atividade de provitamina A	—	+++	(5)

1 - (Di Mascio e col.,1989); 2 - (Conn e col., 1991); 3 – (Miller e col., 1996); 4 – (Conn e col., 1992); 5 – (Zhang e col., 1991); 6 - (Pung e col., 1988); 7 – (Levy e col., 1995)

1.3 - Fontes de licopeno e β-caroteno

Iniciando com o mevalonato, os carotenóides são biossintetizados por uma via especial dos terpenóides (**Figura. 1**) (Yung e col., 1993). A primeira unidade hidrocarboneto formada com C- 40 é o fitoeno, um carotenóide que possui três duplas conjugadas, é enzimaticamente dessaturado para produzir sucessivamente ζ-caroteno, neurosporeno e licopeno. Outros carotenóides, tal como o β-caroteno e oxocarotenóides, são produzidos a partir do licopeno através de ciclização e reações de hidroxilação. Portanto, o licopeno é a molécula central na via de

biossíntese dos carotenóides. Tomate (*Solanum lycopersicum*) e seus produtos são a maior fonte de licopeno em dietas humanas. Existe também no tomate e seus produtos uma certa quantidade de α, β, γ, ζ-caroteno e luteína (Tonucci e col., 1995). Outras fontes de licopeno são melancia, goiaba vermelha e uva roxa (Gross, 1987, 1991; Mangels e col., 1993). Tomates contêm cerca de 30 mg de licopeno/kg de fruto cru (Hart e col., 1995). Altas concentrações são encontradas nos produtos do tomate; por exemplo, no suco de tomate temos 150 mg de licopeno/L e, em "ketchup", cerca de 100 mg/kg. Entretanto, a quantidade de licopeno em produtos concentrados de tomates é geralmente menor do que o esperado, resultado de perdas durante o processamento do produto (Tavares e col., 1994). Na **Tabela II** estão apresentadas as concentrações de licopeno e β-caroteno em frutas e vegetais.

Novas técnicas têm sido utilizadas para detectar e quantificar isômeros do licopeno em alimentos e amostras biológicas (Yeum e col., 1996; Clinton e col., Sander e col., 1994; Di Mascio e col., 1989). Pequenas concentrações de isômeros *cis* têm sido detectadas em produtos processados de tomates (Clinton e col., 1996), enquanto que grandes concentrações ocorrem no plasma e tecidos (Stahl e col., 1992; Stahl e col., 1992; Yeum e col., 1996; Clinton e col., 1996; Krinsky e col., 1990).

Além disso, observa-se que o padrão de isômeros em amostras humanas é qualitativamente similar aos derivados de dietas de ratos contendo produtos derivados de tomates. Observa-se também 12-13 tipos de isômeros diferentes em amostras de plasmas humanos e 14-18

diferentes isômeros em próstata (Clinton e col., 1996). O *trans*-licopeno é o isômero geométrico que se encontra em maior quantidade em tomates frescos, mas a isomerização de *trans* para *cis* ocorre durante o processamento e estocagem. Em vários produtos alimentícios à base de tomates, todos os isômeros *trans* contribuem com 35-96% do licopeno total (Schierle e col., 1996). O isômero 5-*cis* do licopeno foi isolado de tomates maduros e identificado por ressonância magnética nuclear (RMN) (Zumbrunn e col., 1985). A proporção de 5-*cis*-licopeno em alimentos à base de tomates foi de 4-27%; uma pequena quantidade de outros isômeros foi detectada (Schierle e col., 1996). O conteúdo de licopeno em tomates difere de acordo com a variedade de tomate. Algumas destas variedades, como a vermelha, contêm cerca de 50 mg/kg, enquanto que a amarela possui 5 mg/kg (Hart e col., 1995). O conteúdo de muitos carotenóides, incluindo o licopeno, aumenta de acordo com o amadurecimento (Liu e col., 1977). Extratos de carotenóides, de tomates, são usados também como corantes na indústria de alimentos (Nir e col., 1993).

Até o momento, a relevância biológica dos isômeros *cis* é desconhecida. O isômero *cis* difere significativamente em seu formato molecular do isômero *trans*. Desta forma, podemos conjecturar que a habilidade do isômero *cis* em ser incorporado dentro de lipoproteínas ou estruturas lipídicas subcelulares, assim como de interagir com várias proteínas, pode ser significativamente diferente quando comparada ao isômero *trans*. Os isômeros *cis* também têm menor probabilidade de se cristalizarem ou se agregarem, podendo, portanto, ser mais facilmente solubilizados em soluções lipofílicas e mais rapidamente transportados

dentro de células, ou entre tecidos. A possibilidade da participação dos isômeros *cis* do licopeno em reações biológicas específicas ainda precisa ser mais estudada (Steven 1998).

Tabela II

Concentração de licopeno e β-caroteno em frutas e vegetais

Fruta ou vegetal	Licopeno	β-caroteno
	(mg/100 g de porção crua consumida)	
Tomate cru	3,1 – 9,3	0,2 – 0,5
Suco de tomate	6,1 – 10,8	0,3 – 0,9
Polpa de tomate	6,3 – 16,7	0,4 – 1,0
Melancia	4,1	—
Goiaba vermelha	5,2	0,4
Brócolis	—	2,3
Manga	—	1,5
Mamão (papaia)	1,9 – 4,0	0,1 – 0,6
Jerimum Caboclo	—	0,8 – 3,4

(Stahl e col., 1996, Kimura e col., 1991, Khachik e col., 1992b e Mercadante and Rodriguez-Amaya, 1990)

1.4- Cinética, absorção, transporte e metabolismo

Carotenóides exibem distintas propriedades físicas e estruturais. Assim, indubitavelmente, exibem diferenças na dinâmica de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (Parker, 1996; Bierer e col., 1995;

Erdman e col., 1993). Muito do nosso conhecimento é derivado de estudos do β-caroteno; muito pouco se conhece de outros carotenóides. Os carotenóides encontram-se fortemente associados a macromoléculas na maioria dos alimentos, o que deve tornar a sua absorção problemática (Zhou e col., 1996). Muitos fatores influenciam a liberação do carotenóide da matriz física do alimento e a sua dissolução dentro das gotas de lipídios no estômago e duodeno (Erdman e col., 1993). Aquecer o alimento antes da ingestão pode melhorar a biodisponibilidade como um resultado da dissociação do complexo proteína-carotenóide ou da dispersão dos agregados de cristais de carotenóides. Os lipídios têm uma importante função na dissolução dos carotenóides e subseqüente absorção. Por exemplo, licopeno é mais eficientemente absorvido quando o suco de tomate é misturado com um lipídio suplementar (Stahl e col., 1992). Como resultado da ação de sais biliares e lipases pancreáticas, as gotas de lipídios contendo carotenóides entram no duodeno e formam micelas multilamelares (Parker, 1996). A transferência dos carotenóides de dentro das micelas para as células da mucosa parece ocorrer por meio de difusão passiva (El-Gorab, 1975; Hollander e col., 1978).

A capacidade das micelas em incorporar carotenóides pode depender do padrão da dieta em ácidos graxos e da estrutura do carotenóide (Parker, 1996). Absorção deficiente de lipídios ou doenças associadas a este processo, ou ao metabolismo de drogas, podem afetar a absorção de carotenóide. Lipídios não absorvíveis como poliésteres de glicose, que vem sendo adicionados a dieta como substituintes de ácidos graxos, pelo seu caráter hidrofóbico, podem diminuir a absorção de

carotenóides no lúmen intestinal. De fato, a administração de 18 g/dia, em dietas deste tipo, mostra uma redução nos níveis plasmáticos de licopeno na faixa de 30% depois de 16 semanas de consumo (Koonsvitsky e col., 1997).

Quilomícrons são os responsáveis pelo transporte de carotenóides da mucosa intestinal para a corrente sangüínea via sistema linfático (Parker, 1996). Carotenóides são transportados no plasma exclusivamente por lipoproteínas e nenhum outro transportador específico de carotenóide ou proteína transportadora foi identificado (Parker, 1996; Krinsky e col., 1958). As propriedades físicas definidas pelas estruturas dos carotenóides parecem contribuir para a distribuição variada de carotenóides específicos entre as classes de lipoproteínas. Os carotenóides intactos e os produtos da quebra nos enterócitos são incorporados em quilomícrons e secretados dentro do sistema linfático para serem transportados para a corrente sangüínea. Desta maneira, eles são internalizados na corrente sangüínea e os quilomícrons liberam os lipídios pela ação de lipases de lipoproteína, associados com o endotélio e com lipoproteínas do plasma. Os quilomícrons remanescentes são absorvidos pelo fígado através da mediação de um receptor. Os carotenóides lipofílicos, como o licopeno, são distribuídos dentro do corpo hidrofóbico das partículas de lipoproteínas, enquanto que os carotenóides com grupos funcionais polares podem estender-se mais pela interface aquosa da superfície, facilitando a absorção por outras lipoproteínas. Esta orientação dos carotenóides pode influenciar a absorção pelo tecido extra-hepático. Pela estrutura do licopeno e do α e β-caroteno, estes são transportados através

da LDL, enquanto que os carotenóides oxigenados (luteína, zeaxantina, cantaxantina, β-criptoxantina) são mais igualmente distribuídos entre LDL e HDL (Goulinet e col., 1997). O conteúdo de carotenóides e vitamina E é pequeno em LDL oxidada, quando comparado com LDL normal (Goulinet e col., 1997). Os autores concluem que a diminuição destes carotenóides e vitamina E na LDL densa estaria associada a menor resistência dessa partícula a danos oxidativos e também uma menor disponibilidade de antioxidantes nos tecidos alvo em indivíduos com fenótipo associado com esse tipo de LDL.

Um outro problema não resolvido é se a HDL com carotenóides participa em algum tipo de transporte reverso de tecidos extra-hepáticos para o fígado, como o proposto para o colesterol (Parker, 1996; Krinsk e col., 1958). Estudos adicionais devem ser realizados a fim de saber como as lipoproteínas influenciam na distribuição de licopeno para os tecidos e quais as funções de seus isômeros e metabólitos para o organismo.

Depois de internalizado dentro dos enterócitos parte do β-caroteno absorvido é convertido em vitamina A (através de ésteres de retinal). Duas diferentes vias têm sido mostradas *in vivo* para o processo de conversão biológica do β-caroteno em retinal, clivagem central e acêntrica. A clivagem central da cadeia poliênica do β-caroteno envolve uma 15,15'–dioxigenase (Goodman e Olson 1996), que conduz, em um primeiro passo, a duas moléculas de retinal. As outras reações descrevem a clivagem acêntrica descrita por Wang e col. (1991), como ocorre *in vitro*, que produz apo-carotenais. Como o retinal tem sido identificado como sendo o primeiro produto de reação em muitos estudos *in vitro*, a clivagem central é

assumida. Entretanto ainda existem controvérsias com relação a estequiometria da reação de clivagem central sobre a relevância da clivagem acêntrica *in vivo*. Muitas das evidências estão a favor da clivagem central, mas a clivagem acêntrica pode ocorrer dentro de determinadas condições (Wang e col, 1991). Já está bem estabelecido que 20 a 75% do β-caroteno é clivado (Goodman e col., 1966; Van Vliet e col., 1996 e Novotny e col., 1995) e a taxa de quebra é dose dependente e é influenciada pelo nível de vitamina A (Van Vliet e col., 1996).

A concentração média de licopeno no plasma em diferentes populações varia de 50 a 900 nM/L, embora a variação interindividual seja tipicamente muito ampla, com padrão de variação na faixa de 50% ou mais da média. A concentração média de licopeno em diferentes populações do mundo reflete o consumo de tomates e seus produtos. Por exemplo, na América Central, Japão e Senegal, a concentração plasmática em crianças varia de 70 a 120 nM/L, enquanto que crianças nos EUA têm uma média de 800 nM/L. Poucos estudos têm sido feitos para examinar os coeficientes de correlação dos níveis plasmáticos de licopeno com o tempo. Alguns trabalhos mostram que a concentração de licopeno flutua modestamente, exceto quando ocorrem mudanças significativas de ingestão (Apgar e col., 1996). Licopeno parece ser relativamente estável em amostras de sangue, quando estas são coletadas dentro de um padrão clínico de coleta e estocadas a –70° C por muitos anos (Apgar e col., 1996 e Gross e col., 1995).

Diversos estudos têm avaliado a variação nos níveis plasmáticos do licopeno, depois de mudanças na concentração de carotenóides na dieta.

Restrições na dieta de fontes de licopeno resultam num gradual declínio das concentrações plasmáticas de licopeno. Por exemplo, em estudos com indivíduos saudáveis consumindo uma dieta com baixas concentrações de carotenóides, a meia vida plasmática do licopeno foi de 12 a 33 dias e a do β-caroteno foi menor que 12 dias (Rock e col., 1992). Em investigações com suplementação de dietas com alimentos contendo licopeno, verificou-se que as concentrações de licopeno no plasma são restabelecidas muito gradualmente (Carughi e col., 1994; Micozzi e col., 1992). Em seis semanas de estudo com voluntários recebendo 180 mg de suco de tomate contendo 12 mg de licopeno, verificou-se que a concentração de licopeno aumentou somente para 34 nM/L (Carughi e col., 1994). A biodisponibilidade do licopeno foi recentemente avaliada, administrando-se uma dose de tomates frescos ou pasta de tomate, e analisando-se a concentração de licopeno em frações de quilomícrons da circulação sistêmica (Gartner e col., 1993). Cada fonte continha 23 mg de licopeno que foi misturada com 15 g de óleo comestível. A pasta de tomate mostrou um aumento 2,5 vezes maior na concentração de licopeno do que a porção de tomates frescos. Observou-se um aumento significativamente maior de isômeros *cis* depois da ingestão da pasta de tomate do que na de tomates frescos. Estas observações apoiam o conceito de que o processamento do alimento pode aumentar a biodisponibilidade dos carotenóides (Erdman e col., 1993; Zhou e col., 1996; Poor e col., 1993).

Muito pouco se conhece sobre o metabolismo ou degradação do licopeno em mamíferos (Stahl e col., 1996; Gerster, 1997). Poucos metabólitos de licopeno foram detectados em plasma humano ou tecidos.

Por exemplo, 5,6 dihidroxi–5,6 dihidro-licopeno foi detectado por Khachik *e col.*(1997), o qual postula que este composto pode ser um produto de uma reação de oxidação *in vivo* via um epóxido de licopeno como intermediário. Pesquisas adicionais são necessárias na área de técnicas analíticas para estabelecer melhores ferramentas para examinar as quantidades muito pequenas dos metabólitos de licopeno presentes em sangue e/ou tecidos.

1.5 - Distribuição de carotenóides em tecidos

O licopeno e β-caroteno acumulam-se nos tecidos humanos. Este fato é confirmado através da licopenemia e carotenemia após consumo excessivo desses carotenóides (Mathews-Roth, 1988). Um caso de licopenemia foi descrito por Reich e col. (1960) depois de prolongado e excessivo consumo de suco de tomate por uma mulher de meia idade. Tal consumo induziu mudança da coloração da sua pele por meio do aumento do nível plasmático de licopeno e provocou a mudança da cor do fígado para laranja-amarelado. A cor da pele da paciente voltou ao normal depois de três semanas de uma dieta livre de suco de tomate.

Os níveis de licopeno e β-caroteno em tecidos humanos estudados são apresentados na **Tabela III**. Diferenças intra-individuais nos níveis de carotenóides foram encontradas. Mais apropriadamente, altos níveis de licopeno e β-caroteno foram encontrados em fígado, glândulas adrenais e testículos, enquanto que em pulmão e rim, a concentração foi menor. Em estudos realizados nos EUA (Kaplan e col., 1990; Nierenberg e col., 1992; Schimitz e col., 1991), os níveis de licopeno excederam os de β-caroteno

em todos os tecidos analisados, exceto no ovário. Altos valores, tanto de β-caroteno como de licopeno, foram encontrados no fígado, glândulas adrenais e rim. Outro estudo feito na Alemanha (Stahl e col., 1992) confirmou estes dados, mas a concentração de licopeno encontrada no testículo foi maior que o de β-caroteno. Embora carotenóides sejam bastante lipofílicos, seu nível no tecido adiposo é baixo, comparado, por exemplo, com o fígado ou testículos. O tecido adiposo contribui consideravelmente para o conteúdo total de carotenóides no organismo, pois este tecido representa mais de 20% do peso do corpo.

A absorção e a distribuição de licopeno dentro de diferentes tecidos de ratos e macacos foram estudadas depois de aplicação de licopeno marcado radioativamente (Mathews-Roth e col., 1990) e o fígado foi o órgão no qual houve maior acúmulo de licopeno.

Tabela III

Níveis de licopeno e β-caroteno em tecidos de ratos (nmol/g de tecido úmido)

Tecido	Stahl *et al.* (1990)	Kaplan *et al.* (1990)	Nierenberg and Nan (1992)	Schmitz *et al.* (1991)
		Licopeno		
Fígado	1,28	2,45		5,72
Rim	0,15	0,39		0,62
Adrenal	1,90	21,60		
Testículo	4,34	21,36		
Ovário	0,25	0,28		
Adiposo	0,20	1,30		
Pulmão			0,22	0,57
Cólon			0,31	
Pele			0,78	
Mama			0,42	
		β-caroteno		
Fígado	3,02	1,82		4,41
Rim	0,55	0,31		0,55
Adrenal	5,60	9,39		
Testículo	2,68	4,36		
Ovário	0,45	0,97		
Adiposo	0,38	0,38		
Pulmão			0,12	0,35
Cólon			0,17	
Pele			0,71	
Mama			0,27	

1.6 - Complexo Fe-NTA (ácido nitrilotriacético de ferro III)

O ácido nitrilotriacético (NTA) é um ácido aminotricarboxílico sintético que forma complexos solúveis em água com vários cátions metálicos em pH neutro e, por causa dos efeitos ambientais dos fosfatos nos despejos (eutroficação), tem sido usado como substituto de polifosfatos em detergentes para uso doméstico e hospitalar nos Estados Unidos, Canadá e Europa (Mottola, 1974; Anderson e col., 1985).

Estudos iniciais realizados com a forma não-complexada do ácido nitrilotriacético foram descritos na literatura, tendo sido observadas alterações microscópicas nos túbulos renais e uma baixa incidência de tumores no trato urinário de animais experimentais que receberam altas doses de NTA não-complexado (Anderson e col., 1985).

O interesse na toxicidade do ácido nitrilotriacético complexado com metais surgiu quando Awai e colaboradores (Awai e col., 1977; Awai e col., 1979) mostraram a ocorrência de glicosúria e de depósitos de ferro no fígado de ratos, após injeções intraperitoniais de Fe-NTA. Essas alterações eram semelhantes às observadas em pacientes com hemocromatose idiopática, doença hereditária em que há excessiva absorção de ferro ao nível intestinal. O ferro em excesso se acumula no fígado, levando a danos neste órgão, inclusive câncer (Okada e col., 1987). Entretanto, o principal alvo dos danos provocados por nitrilotriacetato de ferro é o rim e foi verificado que a administração intraperitonial de Fe-NTA induz necrose tubular proximal, levando a uma

alta incidência de adenocarcinoma renal em ratos e camundongos (Okada e col., 1983; Hamazaki e col., 1985; Hamazaki e col.,1986; Ebina e col., 1986; Li e col., 1987).

É sabido que Fe-NTA é um potente indutor de peroxidação lipídica. Isso foi demonstrado pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, produção de etano e quimioluminescência em homogenatos de fígado e rins de ratos ou em suspensão de hepatócitos após a adição de Fe-NTA, *in vitro,* ou após injeção intraperitonial (Okada e col., 1987; Yamoni e col., 1984; Goddard e col., 1986; Preece e col., 1988). O aparecimento de dienos conjugados em frações mitocondriais de fígado de ratos tratados com Fe-NTA (Bacon e col., 1983) e a exalação de alcanos com subseqüente aumento de malonaldeído em fígado de camundongos que receberam Fe-NTA (Goddard e col., 1983) também indicam a indução de peroxidação lipídica.

O mecanismo exato pelo qual o complexo Fe-NTA induz o processo de lipoperoxidação não foi ainda completamente entendido.

Foi demonstrada a formação de radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) em soro de ratos 1 hora após a administração de Fe-NTA (Matsura e col., 1983). Tal fato sugere que o complexo de ferro leva à produção desse radical. Para isso é necessário que o ferro do complexo seja inicialmente reduzido por agentes redutores presentes no sangue, tais como ascorbato ou glutationa (Preece e col., 1988). As reações podem ser assim esquematizadas (Preece e col., 1988):

$NTAFe^{3+} + e^{-} \rightarrow NTAFe^{2+}$

$NTAFe^{2+} + O_2 \leftrightarrow [NTAFe^{2+}O_2] \leftrightarrow [NTAFe^{3+}O_2^{-}] \leftrightarrow NTAFe^{3+} + O_2^{\bullet -}$

O radical superóxido formado promove a redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} e produção de H_2O_2 para a subseqüente reação de Fenton (Preece e col., 1988):

$O_2^{\bullet -} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$

$2\ O_2^{\bullet -} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2$

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{-} + HO^{\bullet}$ (reação de Fenton)

Dessa forma, o processo de peroxidação lipídica é iniciado pela abstração, por radicais $HO^{\bullet}$, de átomos de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (Preece e col., 1988).

Entretanto, o radical $HO^{\bullet}$ é muito reativo, sendo pouco provável que radicais $HO^{\bullet}$ formados na fase aquosa atinjam os lipídios das membranas, pois, devem reagir *in situ*. Foi verificado que seqüestradores de radicais $HO^{\bullet}$ não inibem a peroxidação lipídica induzida por ferro *in vitro* (Girotti e col., 1984; Braughler e col., 1986). Tal fato pode ser decorrente da falta de acesso do seqüestrador ao local de geração da espécie reativa (geração sítio específica). Mecanismos alternativos propostos para promover o início do processo de peroxidação lipídica propõem a formação de radicais $HO^{\bullet}$ na vizinhança dos lipídios alvos das membranas (Girotti e col., 1984; Samuni e col., 1981) e a formação de complexos de ferro-oxigênio (Braughler e col., 1986; Minotti e col., 1987). Foi demonstrada a formação de $HO^{\bullet}$ via reação de Fenton envolvendo ferro associado à fase lipídica,

sendo sugerido que o ferro presente no compartimento hidrofóbico das membranas poderia ser responsável pelo início da peroxidação lipídica (Schaich e col., 1988). A carga (Fukuzawa e col., 1998) e a proticidade (Schaich e col., 1988) dos lipídios, que dependem da configuração e composição dos mesmos, e o tipo de quelante (Schaich e col., 1988) afetam a lipofilicidade do ferro. Foi sugerido que Fe^{2+}-NTA entra em contato com os lipídios das membranas e, por isso, induz facilmente a lipoperoxidação (Hamazaki e col., 1989).

O ferro não apenas promove o início da peroxidação lipídica como também afeta as fases de propagação e terminação da mesma (Vaca e col., 1988). Os hidroperóxidos lipídicos formados durante a fase de propagação reagem com Fe^{2+} e reiniciam a peroxidação (Minotti e col., 1988). Quando há excesso de Fe^{2+} ou Fe^{3+}, estes reagem com os radicais lipídicos da fase de propagação e finalizam a reação em cadeia (Vaca e col., 1988). Assim, proporção ótima de peroxidação lipídica é determinada pela razão entre Fe^{2+} e Fe^{3+}, tendo sido demonstrado que essa taxa ocorre quando a razão Fe^{2+}/Fe^{3+} se aproxima de 1 (Minotti e col., 1992).

A indução de peroxidação lipídica por Fe-NTA em células de túbulos proximais renais *in vivo* tem sido explicada segundo o mecanismo descrito a seguir. Foi demonstrado que, primeiramente, é necessária a redução do ferro para que seja iniciada a peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, os quais estão presentes em grande quantidade no córtex renal (onde se encontram os túbulos proximais) (Hamazaki e col., 1989; Okada e col., 1993). Na luz dos túbulos proximais estão presentes as enzimas γ-glutamil transpeptidase (γ-GTP) e dipeptidase, que hidrolizam a

glutationa (GSH) aí presente, liberando os seus aminoácidos constituintes (Hamazaki e col., 1989). A cisteína, um desses aminoácidos, reduz o ferro do complexo Fe^{3+}-NTA para Fe^{2+}-NTA, iniciando-se a lipoperoxidação na orla em escova das células dos túbulos proximais, o que leva à necrose tubular proximal (Hamazaki e col., 1989).

Iniciaram-se, então, trabalhos procurando elucidar o mecanismo pelo qual o complexo Fe-NTA leva à carcinogênese. Há a hipótese de que a ocorrência de tumores em células renais seja devida à indução de danos oxidativos por radicais de oxigênio ao DNA dessas células. Assim, os radicais livres que promovem o início da peroxidação lipídica dependente de ferro também poderiam atacar o DNA, levando, por exemplo, à formação de 8-hidroxideoxiguanosina (8-oxodGuo) (Umemura e col., 1990), a qual induz erro de leitura durante a síntese de DNA *in vitro* (Kuchino e col., 1987). Vários estudos *in vitro* demonstraram a formação de 8-oxodGuo em DNA após incubação com vários agentes geradores de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (Nair e col., 1987; Floyd e col., 1998; Roiser e col., 1989). Estudos *in vivo* também mostraram um aumento no nível de 8-oxodGuo em DNA de rins de ratos 24 horas após uma única administração de Fe-NTA (Umemura e col., 1990). Foram ainda identificadas e quantificadas mais nove bases (tanto purinas como pirimidinas) modificadas por radical $HO^{\bullet}$ em cromatina renal isolada de ratos tratados com Fe-NTA (Toyokuni e col., 1994). Além da observação desses danos em bases do DNA, foram detectadas quebras em DNA incubado com Fe^{3+}-NTA na presença de H_2O_2, L-cisteína ou L-ascorbato (Inoue e col., 1987; Toyokuni e col., 1993). Foi sugerido que essas

quebras também podem estar envolvidas na carcinogênese induzida por Fe-NTA (Yamada e col., 1990), uma vez que podem resultar em aberrações cromossômicas e transformação celular (Brayant e col., 1984; Brayant e col., 1989).

Entretanto, há dúvidas de que os danos ao DNA resultantes de reações com radical $HO^{\bullet}$ são os únicos responsáveis pela carcinogênese induzida por sistemas geradores de radicais livres (Inoue e col., 1987). Isso porque algumas das lesões identificadas no DNA são pró-mutagênicas, enquanto que a mutagenicidade de outras dessas lesões ainda não foi investigada (Breimer e col., 1990), já tendo sido verificada a ocorrência de reparo das mesmas (Toyokuni e col., 1994). Dentre as lesões estudadas, é sabido que 8-oxodGuo induz a transversões G:C → T:A que podem ativar o oncogene *ras* por mutação de ponto (Higinbotham e col., 1992).

Há indícios de que a formação de bases modificadas no DNA se dá no mesmo curso de tempo da peroxidação lipídica (Okada e col., 1991). Sendo assim, os produtos da lipoperoxidação podem desempenhar um importante papel na indução de danos ao DNA *in vivo* (Inoue e col., 1987; Park e col., 1992). Conseqüentemente, torna-se importante o estudo de danos ao DNA induzidos por estresse oxidativo, relacionando-os ao processo de peroxidação lipídica (Park e col., 1992). O maior problema em elucidar os mecanismos responsáveis pela genotoxicidade do processo de peroxidação lipídica é a discriminação entre danos ao DNA causados pela ação direta dos radicais livres e o papel destes na iniciação da peroxidação lipídica, sendo o dano causado pela reação do DNA com

produtos finais da lipoperoxidação (Vaca e col., 1988). Na verdade, há efeitos diretos e indiretos, bem como vários tipos de danos ao DNA, tais como quebras (Inoue, 1984), mudanças estruturais (Reiss e col., 1973) e hidroxilação de bases (Park e col., 1992).

1.7 - A lipoperoxidação

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem danificar não só o DNA, mas também outros componentes celulares. Muitos fosfolipídios contêm ácido graxo poliinsaturados e a presença de grupos metilênicos entre duplas ligações faz com que fiquem susceptíveis a oxidação (Porter, 1986). Esses ácidos graxos poliinsaturados são, para os oxidantes, alvos mais prováveis do que o DNA, uma vez que são mais abundantes (Wagner e col., 1994). É estimado que 60 moléculas de ácido linoleico (o ácido graxo poliinsaturado mais comum nas células) são consumidas por oxidante que reage com a bicamada lipídica (Howard, 1973). Como essa oxidação desencadeia uma cascata autocatalítica que gera numerosas substâncias genotóxicas, tais danos aos lipídios podem ter grandes implicações para a integridade do DNA.

A peroxidação lipídica se inicia pelo ataque de qualquer espécie suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metilênico presente entre átomos de carbono que participam de ligações duplas nos ácidos graxos poliinsaturados. Esses átomos de hidrogênio (bis-alílicos) estão mais fracamente ligados ao respectivo carbono devido à presença das duplas ligações nos átomos de carbono adjacentes.

Espécies tais como $HO^{\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$ e $RO_2^{\bullet}$ podem, termodinamicamente, realizar essa oxidação. Após iniciado, o processo torna-se autocatalítico, levando à formação de hidroperóxidos e produtos secundários. A **Figura 2** resume as três fases do processo. A iniciação ocorre com a abstração de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado (LH), levando à formação de um radical lipídico ($L^{\bullet}$). Este sofre um re-arranjo rápido e adquire a estrutura de dieno conjugado. A adição extremamente rápida de uma molécula de oxigênio ao radical lipídico leva à formação do radical peroxil ($LOO^{\bullet}$). Este é capaz de reagir com outro ácido graxo poliinsaturado, iniciando uma nova cadeia de oxidação que leva à formação de hidroperóxido lipídico (LOOH) e outro radical lipídico ($L^{\bullet}$). A fase de propagação compreende o início de uma nova cadeia de oxidação pelo radical peroxil ($LOO^{\bullet}$) e a decomposição dos hidroperóxidos lipídicos em outros radicais intermediários (Vaca e col., 1988).

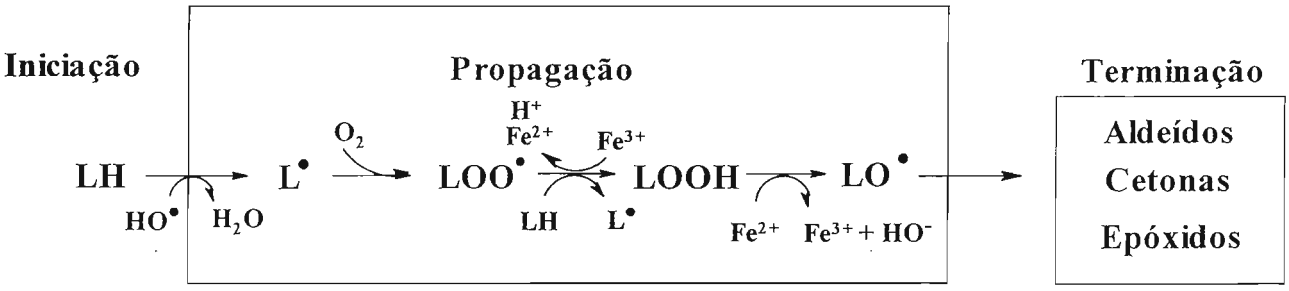

Figura 2 -Representação das fases da peroxidação lipídica (esquema modificado de Vaca e col., 1988).

Os hidroperóxidos lipídicos são instáveis na presença de metais de transição, tais como ferro ou cobre, originando radicais alcoxil ($LO^{\bullet}$) e peroxil ($LOO^{\bullet}$):

$$LOOH + Fe^{2+} \rightarrow LO^{\bullet} + OH^{-} + Fe^{3+}$$

$$LOOH + Fe^{3+} \rightarrow LOO^{\bullet} + H^{+} + Fe^{2+}$$

A decomposição dos hidroperóxidos lipídicos é importante porque, além de gerar radicais que propagam a peroxidação lipídica, também gera produtos não radicalares. Esses produtos secundários (aldeídos, cetonas, epóxidos, entre outros) são mais estáveis do que os radicais livres que iniciaram o processo e os radicais lipídicos formados durante a fase de propagação. Conseqüentemente, podem atingir pontos distantes do local em que se formaram (Vaca e col., 1988). Os sistemas biológicos contêm uma mistura de diferentes ácidos graxos poliinsaturados com vários graus de insaturação. Sendo assim, a peroxidação lipídica irá gerar uma mistura de hidroperóxidos lipídicos cujas quebras podem produzir uma variedade de aldeídos diferentes e espécies radicalares. Entretanto, o significado biológico de todos os possíveis produtos ainda não está bem claro (Cheeseman, 1993).

Um número crescente de trabalhos têm mostrado que os aldeídos ou interagem diretamente com o DNA e causam danos genéticos, ou são metabolizados a epóxidos, compostos conhecidos por serem agentes alquilantes do DNA com alta atividade mutagênica (Ehrenberg e col., 1977; Segerbäck, 1983, Cadet e col., 1999; Carvalho e col., 2000; Loureiro e col. 2000). Os produtos finais mais extensivamente estudados são os aldeídos e, dentre estes, o malonaldeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE).

1.8 – Danos em DNA

O ácido desoxirribonucléico (DNA), por ser o banco das informações genéticas, possui um papel central na vida celular. O processo de replicação permite que o DNA faça cópias de si mesmo quando a célula se divide doando as células filhas as características da célula original. Portanto, a manutenção da integridade da estrutura dessa macromolécula é fundamental. Entretanto, modificações na estrutura química das bases, quebras de ligações e de fitas ocorrem por diversos agentes externos e internos. Erros também podem acontecer durante os processos de replicação e recombinação do DNA, levando à incorporação de uma ou mais bases erradas.

O desenvolvimento de métodos analíticos ultra-sensíveis mostrou que além da instabilidade química intrínseca da molécula do DNA, um nível basal de danos no DNA pode ser verificado em tecidos de animais e humanos normais. Isso indica que agentes internos, como produtos gerados no metabolismo energético celular, são capazes de danificar o DNA (Bartsch, 1999).

1.8.1 - Lesões em DNA promovidas por espécies reativas do oxigênio

Reações de oxidação em ácidos núcleicos em células ocorrem sob diversas condições de estresse oxidativo, incluindo o metabolismo de xenobióticos e exposição a agentes físicos como raios-γ, pulsos de laser de alta intensidade, radiação solar, etc. A principal espécie reativa de

oxigênio formada durante a homólise de moléculas de água ou pela decomposição de peróxido de hidrogênio catalisada por metal (reação de Fenton), é o radical hidroxila (Halliwell e Gutteridge, 1999) e ele pode induzir modificação na base ou no resíduo de açúcar do DNA. O ânion radical superóxido e suas formas ácidas conjugadas, não apresentam reatividade significante, pelo menos em meios hidrofóbicos (Cadet e Téoule, 1978). O peróxido de hidrogênio gerado pela dismutação do ânion radical superóxido é fracamente reativo, mas pode difundir através das membranas celulares. O peróxido de hidrogênio pode reagir especificamente com resíduos de adenina e também está envolvido na reação de Fenton (Cadet e Téoule, 1978). Outra espécie biologicamente importante é o oxigênio singlete, o qual pode ser gerado por reações enzimáticas ou fotossensitizações (Cadet, 1994; Ravanat e col.2000; Martinez e col., 2000).

1.8.2 - Radical hidroxila

A geração do radical hidroxila em organismos vivos tem sido atribuída principalmente à redução do peróxido de hidrogênio por Fe^{+2} (reação de Fenton) (Hatahet e col. 1993). Por ter alta reatividade, esta espécie pode reagir com diversas biomoléculas. Diversos produtos já foram identificados pela reação de $HO^{\bullet}$ com as bases nitrogenadas, nucleosídeos ou com a molécula de DNA (**Figura 3**).

O radical hidroxila pode se adicionar em purinas, por exemplo, adição na posição oito da dG produz um intermediário radicalar que pode

gerar 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (Fapi-dG) (Singer e col. 1989) após oxidação e protonação e 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG) (Spratt e col. 1994) após redução. Embora não seja necessariamente o principal produto de oxidação do DNA, a 8-oxodG tem sido extensivamente estudada devido à facilidade com a qual pode ser medida em tecidos e fluidos biológicos.

O radical hidroxila pode também abstrair elétrons do resíduo de açúcar levando a formação de um radical centrado no carbono 5' da dG ou dA e este por sua vez, ataca a dupla ligação C-8,N-7 formando os produtos (5'*R* ou *S*)-ciclodG (Preston e col. 1986) e (5'*R* ou *S*)-ciclodA (Preston e col. 1987).

As pirimidinas podem também ser atacadas pelo $HO^{\bullet}$. Abstração de elétron ou do grupo metila da timina gera radicais que posteriormente são decompostos em timina-glicóis (Li e col. 1987). Também podem sofrer adições do $HO^{\bullet}$ às duplas ligações, a citosina, por exemplo, é convertida a 5-OH-dC após ataque do $HO^{\bullet}$ na dupla ligação C-5,C-6 (Bodepudi e col. 1991).

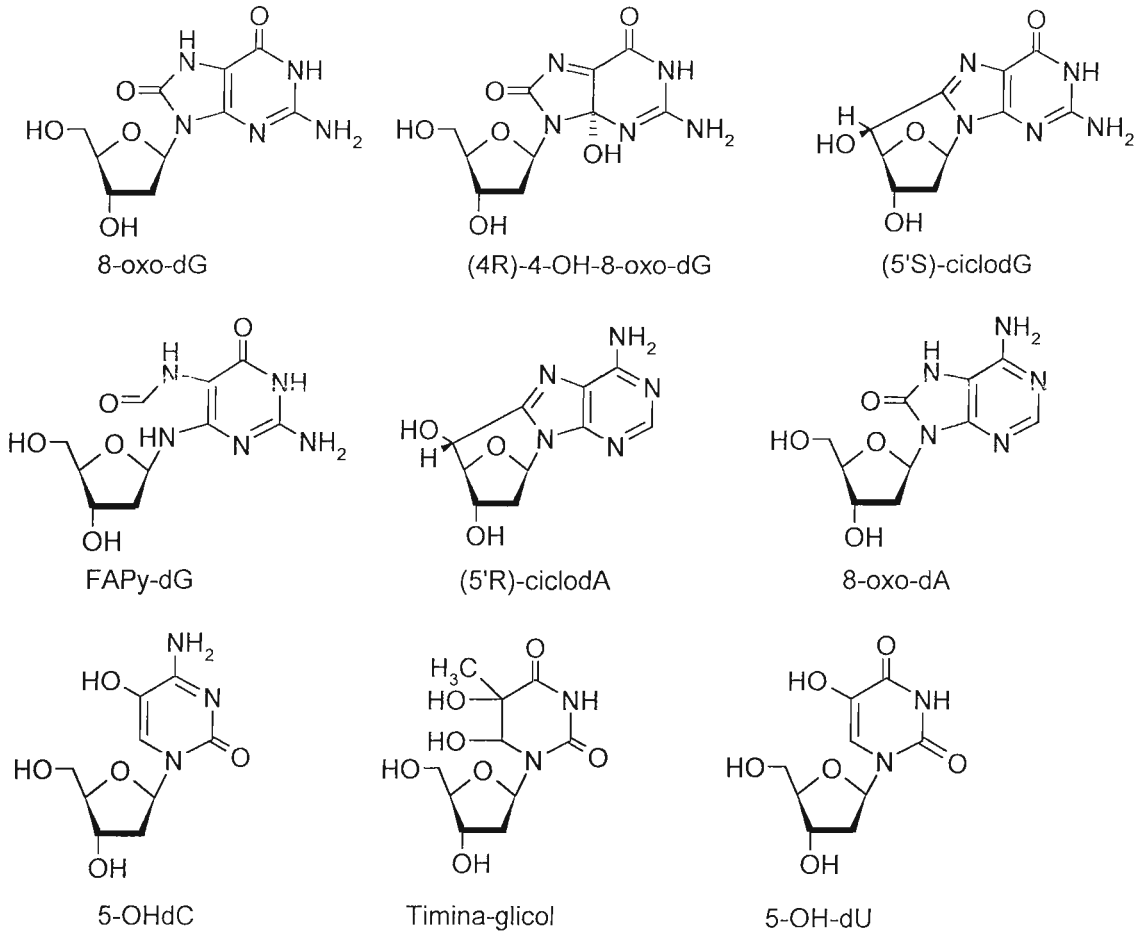

Figura 3: Exemplos de produtos gerados pela reação do radical hidroxila com as bases do DNA (Carvalho, 2001).

1.8.3 - Oxigênio singlete

O oxigênio no estado excitado pode apresentar-se em duas formas o $^1\Delta_g$ e o $^1\Sigma_g^+$, tendo o primeiro nível energético 22 kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média alta (*ca.* 2-4 μs em H_2O) e o segundo tem energia de 37,5 kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média muito menor, decaindo rapidamente para o estado $^1\Delta_g$. Considerando

estas características, a única forma de oxigênio singlete que apresenta interesse em sistema biológicos é a forma $^1\Delta_g$, que será denotado por $^1O_2$.

A formação $^1O_2$, em sistemas biológicos tem sido amplamente demonstrada e relacionada com processos celulares diversos tais como o mecanismo de defesa contra vírus e bactérias promovido por células fagocitárias. Os possíveis mecanismos de formação desta espécie em sistemas biológicos incluem reações de quimioexcitação (reações no escuro) catalisadas por peroxidases (mieloperoxidase) ou oxigenases (lipoxigenase ou ciclooxigenase); a reação de peróxido de hidrogênio com hipoclorito ou peróxinitrito; termodecomposição de dioxetanos entre outras. O oxigênio singlete é uma das principais espécies envolvidas nos efeitos citotóxicos da terapia fotodinâmica. Esta espécie apresenta alta reatividade, oxida muitas moléculas orgânicas ricas em elétrons, como sulfetos, aminas e fenóis. Sendo assim, são importantes alvos biológicos do $^1O_2$ moléculas fundamentais como ácidos graxos insaturados, proteínas e DNA (Di Mascio e col., 1995).

A reatividade do $^1O_2$ em relação aos ácidos nucléicos tem sido amplamente discutida (Sies, 1993; Di Mascio e col., 1989; Cadet e col., 1997 e Briviba e col., 1997) e quebras em fitas e sítios álcali-lábeis foram identificados em DNA exposto a diferentes fontes de $^1O_2$ (Blazek e Peak, 1989 e Di Mascio e Sies, 1989). Sítios de oxidação de guaninas foram encontrados adjacentes as quebras fosfodiéster (Cadet e col. 1997)

É importante ressaltar que a mutagenicidade do $^1O_2$ já foi reportada em bactérias (Di Mascio e col., 1990) e em células de mamíferos (Ribeiro e col., 1992)

Em DNA, $^1O_2$ reage preferencialmente com resíduos de desoxiguanosina (dGuo), levando a formação de diferentes produtos de reação (**Figura 4**): incluindo a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) que uma vez produzida reage dez vezes mais rápido com $^1O_2$ gerando ácido cianúrico, 2,2-diamino-4-[-(2-desoxi-β-D-eritro-pentafranosil)amina]-5-(2H)-oxazolona (Oxazolona) e os distereisômeros 4R* e 4S* da 4-OH-8-oxodGuo (Duarte e col., 2000 e Sheu e Foote, 1995)

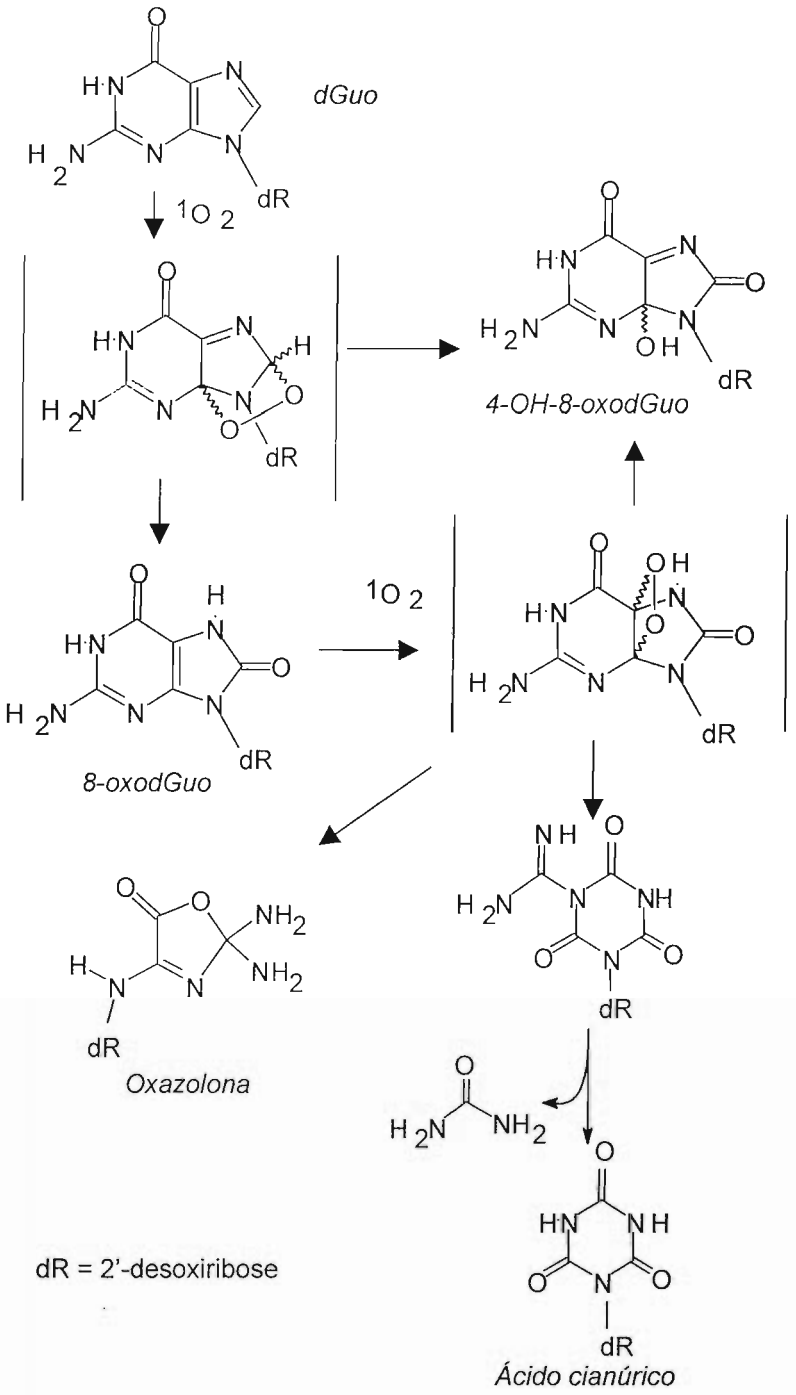

Figura 4. Principais produtos de oxidação da 2'-desoxiguanosina (dGuo) gerados por oxigênio singlete.

1.9- Carotenóides na prevenção de doenças

Diversos trabalhos têm apontado que indivíduos com dieta pobre em carotenóides ou com níveis plasmáticos baixos dessas espécies têm maiores riscos de doenças degenerativas (Sies e Krisnky, 1995) Entretanto, uma associação causal definitiva, em estudos com humanos, entre os efeitos benefícios para a saúde e carotenóides ainda precisa ser estabelecida.

1.9.1 – Licopeno, β-caroteno e câncer

Até um passado recente pouca atenção estava sendo dada para os benefícios à saúde fornecidos pelos tomates. Entretanto, diversos estudos têm indicado fortes associações entre dietas ricas em carotenóides e redução no risco de câncer (Machlin, 1995 e Van Poppel e Goldbohm, 1995). Apesar dos poucos estudos epidemiológicos ainda não fornecerem dados totalmente consistentes, alguns indicam uma associação inversa entre dieta rica em β-caroteno ou níveis plasmáticos aumentados de β-caroteno e risco de câncer (Buring e Hennekens, 1995). Ressaltamos, entretanto, que um estudo realizado na Finlândia não apontou nenhum benefício para a saúde em um grupo de pessoas suplementado com β-caroteno tendo sido observado, na verdade, uma tendência de aumento de risco em indivíduos fumantes (Cancer Prevention Study Group, 1994)

Recentemente, as propriedades antioxidantes do licopeno, carotenóide consumido largamente através dos tomates, têm aumentado o interesse nesse fruto como um alimento com propriedades potenciais anticâncer (Di Mascio e col. 1989). De fato, um consumo mais elevado de tomates é compatível com as recomendações para um aumento na ingestão de frutas e vegetais. Contudo é importante estabelecer se os únicos benefícios derivam apenas dos tomates uma vez que tomates são usados em muitos itens processados que não são necessariamente associados com o consumo de fruta ou vegetal. Estes itens incluem o molho de tomate, sopa de tomate, ketchup, e pasta de tomate. Além disso, muitos destes alimentos processados são melhores fontes de licopeno na forma biodisponível do que os tomates frescos (Stahl e col. 1992, Tonucci e col. 1995 e Gartner e col. 1997).

Em 1999 Giovannucci revisou todos os estudos em humanos registrados na língua inglesa sobre tomates ou licopeno em relação ao risco de qualquer tipo de câncer. Uma vez que a ingestão do tomate ou nível de licopeno no sangue foi freqüentemente um dos numerosos fatores dietéticos examinados, registros epidemiológicos que tinham frutas, vegetais, ou carotenóides como palavras chave foram examinados considerando os resultados relativos a tomate ou licopeno. O autor concluiu alguns aspectos que resumimos a seguir.

Dois tipos gerais de modelo de estudo têm sido usados para examinar o licopeno e produtos com tomate em relação ao risco de câncer. Um modelo de estudo tem sido baseado em questionários de dieta, usados para avaliar diretamente os produtos com tomate ou para

pressupor o consumo de licopeno; o outro modelo de estudo tem sido baseado em medidas dos níveis de carotenóides em amostras sangüíneas armazenadas. Entre 72 estudos selecionados, 57 encontraram associações inversas entre o consumo de tomate ou licopeno ou nível de licopeno no sangue e risco de câncer; 35 destas associações inversas foram estatisticamente significativas. Os 15 estudos restantes foram inconclusivos ou indicaram uma associação direta fraca.

Comparações por sexo tenderam a mostrar mais estudos com associações inversas para homens, mas a maioria dos estudos também indicou um benefício para mulheres. Para os tipos de câncer, como de pulmão ou estômago, nos quais ambos os sexos estão em risco, os estudos não indicaram diferenças marcantes entre os sexos.

Uma tendência de associação inversa entre o consumo de tomates ou produtos com tomate ou níveis de licopeno foi observada para casos de câncer em diversos sítios anatômicos. Os dados mais indicativos são para o câncer próstata, pulmão e estômago. Os resultados também indicam proteção para outros tipos de câncer como pancreático, colorretal, esofágico, oral, de mama e cervical.

O resultado mais impressionante foi o obtido com os participantes do "Health Professionals Follow-up Study" (Giovannucci e col., 1995), onde dados obtidos de 773 casos de câncer de próstata revelaram que o aumento da ingestão de alimentos ricos em licopeno (tomates, molho de tomates, pizza) estava fortemente associado com um menor risco deste tipo de câncer. O estudo ressalta que não foi encontrada essa correlação

quando a análise foi feita para α- e β-caroteno, luteína ou cryptoxantina, indicando uma atividade benéfica específica de licopeno.

Apesar dos benefícios dos tomates e de produtos com tomate serem freqüentemente atribuídos ao carotenóide licopeno, estudos mostrando benefícios diretos do licopeno ainda não foram conclusivos e outros compostos presentes somente em tomates ou que possam interagir com o licopeno podem ser importantes. É crítico reconhecer que as evidências atuais considerando a ingestão dietética e concentrações de licopeno no sangue refletem o consumo de tomates e produtos com tomates em lugar de suplementos de licopeno purificados. As propriedades farmacocinéticas do licopeno permanecem pobremente compreendidas e o autor considera prematuro recomendar o uso de doses farmacológicas de licopeno para qualquer benefício à saúde. São claramente necessários mais estudos sobre biodisponibilidade, farmacologia e biologia deste carotenóide potencialmente importante. Até que dados mais definitivos considerando benefícios específicos de formas purificadas do licopeno estejam disponíveis, as recomendações atuais devem enfatizar os benefícios à saúde de dietas ricas em uma variedade de frutas e vegetais, incluindo tomates e produtos derivados do tomate (Giovannucci 1999).

Em resumo, os dados epidemiológicos indicam que os consumidores de altos níveis de tomates e produtos com tomate têm riscos substancialmente menores para diversos tipos de câncer, mas não provavelmente para todos os tipos de câncer. Os resultados são consistentes para uma variedade de tipos de câncer avaliados em populações numerosas e diversas e com o uso de diferentes tipos de

modelos de estudo. Estes incluem estudos ecológicos, caso-controle de dieta, estudos prospectivos de dieta e investigações baseadas em marcadores sangüíneos.

2 - OBJETIVOS

Um número crescente de evidências experimentais e epidemiológicas sugere que o licopeno e o β-caroteno, presentes em tomates, produtos de tomates, muitas frutas e vegetais podem prevenir certos tipos de câncer em humanos. Por outro lado, estudos *in vitro* têm demonstrado a habilidade desses carotenóides em seqüestrar radicais peroxila e suprimir oxigênio singlete, este estudo visa investigar em células em cultura e *in vivo* os possíveis mecanismos bioquímicos nesse processo. Entretanto, para estabelecer firmemente as relações do licopeno com a com a prevenção de doenças, maiores informações sobre os possíveis mecanismos bioquímicos associados com esses processos são necessárias. Com este intuito, este trabalho teve como objetivo investigar o efeito do licopeno e do β-caroteno em células de mamífero e em ratos submetidos a excesso de ferro, sistema conhecido por promover o estresse oxidativo com lesões em biomoléculas.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram os mais puros comercialmente disponíveis. Soro fetal bovino (SFB) foi proveniente da Cultilab — materiais para cultura de células (Campinas, SP, Brasil). Clorofórmio e etanol (P.A.) foram fornecidos pela Cinética Química (São Paulo, Brasil). 2'-Desoxiguanosina, ácido fórmico, tetrahidrofurano (THF), metanol, hidróxido de sódio, fosfato de potássio monobásico, sulfato de magnésio, ácido fosfórico e ácido perclórico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Fosfatase alcalina e nuclease P1 foram provenientes da Pharmacia Biotech (Upsala, Suécia). Acetonitrila e metanol grau cromatografia foram adquiridos da EM Science (Gibbstown, NJ). Carbonato de sódio anidro foi fornecido pela Mallinckrodt Chemical (Paris, França); azul de tripan pela Nuclear (São Paulo, Brasil); alaranjado de xilenol pela Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda. (Diadema, SP, Brasil); tubos Supelclean LC-18 (6 mL, 1 g) pela Supelco (Bellefonte, PA) e filtros Ultrafree-Mc (10,000 NMWL) e Ultrafree-Mc (poro: 0,22 μm) pela Millipore (Bedford, MA). Todos os outros reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). CHELEX, RNAses A e T1, fenol, proteinase K, licopeno (foi uma dação do Dr. Zohar Nir, LycoRed Natural Products Industries Ltd. (Beer-Sheva, Israel); β-caroteno, ácido tiobarbitúrico (TBA), cloreto férrico, cloreto de sódio, éter etílico, n-butanol e EDTA foram obtidos da Sigma Co (St. Louis, MO). Ficoll paque plus, Pharmacia. Todas as soluções foram preparadas com água Milli Q. Filtros da Milipore. A água foi deionizada em um sistema Milli-Q (Millipore).

3.2 - Equipamentos

Os espectros de absorbância foram adquiridos em um espectrofotômetro Hitachi U3000 (Tokyo, Japão). As medidas de fluorescência foram feitas em um espectrofluorímetro Spex modelo 1681 (Spex Industries, Edison, NJ). Para as centrifugações foram utilizadas as centrífugas refrigeradas modelos Centrifuge 5403 da Eppendorf (Hamburg, Alemanha) e Himac CR21E da Hitachi. As incubações que necessitavam de agitação foram feitas em um Orbital Incubator Shaker, Gyromax TM 703 (Amerex Instruments, Lafayette, CA). As observações microscópicas foram feitas em um microscópio invertido Diaphot 300 da Nikon (Tokyo, Japão). As soluções foram autoclavadas em autoclave vertical modelo 415 da Fanem (São Paulo, Brasil). As medidas de pH foram feitas em um potenciômetro da Corning modelo 320 (Sigma). As células foram incubadas em uma estufa de CO_2 Napco®, modelo 5100 da Precision Scientific (Chicago, Illinois). Foram utilizados balança analítica da A&D Company (Tokyo, Japan), banho maria modelo 144 da Fanem e um módulo para esterilização do ar, equipado com luz UV (EACI/ENVIRCO Environmental Air Control, Albuquerque, NM). Os outros equipamentos serão descritos junto com a técnica empregada.

3.3 - Cultivo das células

Meio de cultura: meio Eagle modificado por Dulbecco (DME) suplementado com $NaHCO_3$ (1,2 g/L), 100 μg/mL de penicilina, 94 μg/mL de sulfato de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB). O meio de cultura sem suplementação com SFB foi esterilizado por filtração através de membrana de 0,22 μm diretamente para o interior de frascos estéreis. Foram utilizados filtros estéreis descartáveis da Corning. O SFB estéril foi adicionado a alíquotas do meio estéril de acordo com a necessidade de uso.

Soluções:

PBS: 137 mM NaCl, 1,68 mM KCl, 1,47 mM Na_2HPO_4, pH 7,0. Solução autoclavada.

Tripsina: 0,05% (p/v) de tripsina em PBS (pH 7,0) contendo 1 mM de EDTA. Solução esterilizada por filtração através de membrana de 0,22 μm diretamente para o interior de frascos estéreis.

Fibroblastos renais de macaco verde africano, linhagem CV1-P, doados pelo Prof. Rogério Meneghini, foram cultivados no meio de cultura suplementado, em atmosfera com 5% de CO_2, a 37°C, no escuro. As células cresceram aderidas à superfície de garrafas plásticas de cultura e foram repicadas em períodos de 5 a 6 dias.

Procedimento para o repique das células: após a retirada do meio, a cultura foi lavada 2 vezes com PBS. A seguir, foi incubada a 37°C com volume mínimo (5 mL) de solução de tripsina até que as células se

desprendessem (± 2 min). As células foram, então, ressuspensas no meio de cultura suplementado e a suspensão distribuída para novas garrafas ou placas na diluição desejada.

Tais células foram, posteriormente, submetidas ao tratamento com nitrilotriacetato de ferro (Fe-NTA) para que se pudesse medir o índice de lipoperoxidação bem como a proteção da lipoperoxidação com a solução de licopeno.

3.4 - Tratamento das células

3.4.1 - Solução estoque de licopeno

O licopeno foi inicialmente dissolvido em 1 mL de THF (tetrahidrofurano) destilado para completa dispersão dos cristais. Este extrato foi filtrado em membranas de 0,45 μm e a concentração (3 mM) foi determinada espectrofotometricamente em um Ciba-Corning 2800 Spectran (Ciba-Corning Analytical, Essex, England) e estocada a –70°C (Joseph e col., 1995).

3.4.2 - Tratamento e absorção de licopeno pelas células

Nove placas contendo 1 x 10^6 células foram incubadas com licopeno por 2 h em condições apropriadas e a concentração de licopeno no meio de cultura depois da extração (2,6 ± 0,6 μM) foi sistematicamente analisada por espectrofotometria (Joseph e col., 1995). A concentração de THF de 0,5% não afeta o crescimento celular. Todo o procedimento foi

realizado na ausência de luz. As placas com experimentos controle não foram tratadas com a solução de licopeno e foi feito o controle com THF. Depois deste tempo, o meio de cultura suplementado com licopeno foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com solução de PBS-A. Para a análise de licopeno absorvido pelas células foram sempre separadas 3 placas. As demais placas foram submetidas ao tratamento com Fe-NTA, descrito abaixo. As células foram raspadas das placas. O licopeno foi extraído das células como descrito por Lowe e col. (1999), usando 1 mL metanol e 1 mL de 1 M NaCl, seguido da adição de 1,5 mL de éter dietílico e 1,5 mL de hexano em tubo de ensaio. As amostras foram vigorosamente agitadas e as fases foram separadas. A fase orgânica foi removida e seca em atmosfera de nitrogênio a 30°C no escuro; os resíduos foram ressuspensos em 100 μL da fase móvel e a concentração de licopeno foi analisada por um sistema de HPLC da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japan), o qual inclui duas bombas LC-10AD, um injector Rheodyne e um detector photodiode array SPD-M10AV, controlado por um módulo de comunicação CBM-10A e um software CLASS LC-10AWS. As condições do HPLC foram: uma coluna de fase reversa C-18 (Spherex, 250 x 4.6 mm, 5 μm) usando um sistema de isocrático de solventes, composto por acetonitrila: THF: metanol (68:22:10 v/v/v), com 0.025%(p/v) acetato de amônia a um fluxo de 1 mL /min. O licopeno foi detectado pela absorbância de 460 nm.

3.4.3 - Nitrilotriacetato de ferro (Fe-NTA)

A solução de Fe-NTA foi preparada a partir de concentrações (0,01 M) de $FeCl_3.6H_2O$ e (0,04 M) de ácido nitrilotriacético (NTA). Essas duas substâncias foram dissolvidas em água e o pH ajustado para 7,3 com NaOH, servindo como solução estoque.

Após as células terem sido suplementadas por 2 h com a solução de licopeno em meio de cultura com 10% SFB, o meio de cultura foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com solução de PBS-A. A solução de Fe-NTA foi diluida em um novo meio de cultura (DME + SFB 10%), resultando na concentração final de 1 mM Ferro para 4 mM de NTA, juntamente com 200 µL de uma solução 40 µM de ácido ascórbico e foi adicionado às placas de cultura contendo as células suplementadas com o licopeno. Os experimentos sempre foram realizados em triplicata: 3 placas suplementadas com licopeno + Fe-NTA; 3 placas tratadas somente com Fe-NTA; 3 tratadas somente com licopeno e 3 placas controle somente com o meio de cultura com 10% de SFB. As células ficaram expostas a este sistema por (2 h) e posteriormente foram avaliados os níveis de lipoperoxidação, foram efetuadas as dosagens de NPSH e de proteína total e foi feita a extração do DNA para avaliação de possíveis danos.

3.5 - Determinação da lipoperoxidação através da medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS

Inicialmente são preparados padrões de malonaldeído através da diluição de uma solução estoque de 10,6 μM, para concentrações de 0,2 nmol; 0,4 nmol; 0,6 nmol; 0,8 nmol; e 1,0 nmol. São preparadas soluções estoques de: SDS 1,7%, EDTA 40 mM, solução 0,67% de ácido tiobarbitúrico em solução 10% de ácido tricloroácetico, solução de BHT a 2% em etanol, Fe-NTA ($FeCl_3$ 0,01 M e NTA 0,04 M) e duas soluções estoque de ácido ascórbico 2 mM e 1 mM.

Depois que as células atingem a confluência desejada, aspira-se o meio das placas e adiciona-se quantidades de meio que resulte em uma concentração final de Fe-NTA (0,01 mM de $FeCl_3$ e 0,04 mM de NTA) e 40 μL para um volume final de 20 mL em cada placa. Incubam-se placas em triplicatas para cada tempo de tratamento: 1, 2 e 3 h. A seguir aspira-se o meio e incubam-se as células com 1 mL de tripsina, até que as células desprendam-se das placas, ressuspende-se em 1 mL de PBS-A. Separam-se 700 μL para análise com TBA e 300 μL para análise de proteína. À suspensão de 700 μL adiciona-se 300 μl de SDS 1,7%, 50 μL de solução 40 mM de EDTA, em seguida 1 mL de TBA preparado em solução de ácido tricloroácetico a 10%, aquece-se a 90°C durante 20 min, esfria-se em gelo e faz-se extração com 2 mL de butanol. Centrifuga-se por 10 min a 3000 rpm. Coleta-se a fase orgânica (sobrenadante) para análise de fluorescência (λ excitação= 515 nm e λ emissão = 550 nm).

Branco: todos reagentes adicionados menos a amostra. Para calibração dos dados de fluorecência foi usado 1,1,3,3-tetraetoxipropano, como um produto quantitativo do aduto de malonaldeido-TBA. Os dados foram expressos como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúricos (TBARS) por conteúdo de proteína em células, determinado pelo metodo de Bradford. Os dados da fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro Spex modelo 1681 (Spex, Edison, NJ). A análise estatística foi feita pelo Student's t-test (Hartwig e col., 1993).

3.6 - Viabilidade celular

Determinação da viabilidade celular pelo método de coloração com azul de tripan.

Soluções: PBS - 137 mM NaCl, 1,68 mM KCl, 1,47 mM Na_2HPO_4, pH 7,0. Azul de tripan - 0,4% de azul de tripan em água (p/v).

Este método se baseia no princípio de que células viáveis não adquirem coloração, enquanto as células não-viáveis adquirem (Patterson, 1979).

As células (~ 1 x 10^6) foram lavadas 2 vezes com PBS e ressuspensas em 2 mL desse tampão. Em um tubo foram misturados 500 μL de solução de azul de tripan, 200 μL de PBS e 300 μL da suspensão de células. Após 5 min foi iniciada a contagem das células utilizando-se um hemocitômetro.

Cada quadrado do hemocitômetro, com a lamínula no local certo, representa um volume total de 0,1 mm^3 ou 10^{-4} cm^3. Desde que 1 cm^3

equivale a aproximadamente 1 mL, o subseqüente número de células por mL e o número total de células foram determinados usando-se os seguintes cálculos:

células/mL = média das células contadas em cada quadrado x fator de diluição x 10^4

total de células = (células/mL) x volume original da solução da qual a amostra de células foi removida

viabilidade celular (%) = células viáveis totais (não coradas) ÷ total de células (coradas e não coradas) x 100

O gráfico de sobrevivência relativa foi feito dividindo-se a viabilidade das células tratadas pela viabilidade das células controle.

3.7 - Dosagem de sulfidrilas não-protéicas (NPSH)

Soluções

PBS: 137 mM NaCl, 1,68 mM KCl, 1,47 mM Na_2HPO_4, pH 7,0.

Solução A: 2 M $HClO_4$, 4 mM EDTA.

Solução B: 2 M NaOH.

Solução C: 300 mM tampão fosfato, pH 8.

DTNB: 3,5 mM DTNB em tampão fosfato 100 mM, pH 7.

Após os tratamentos, as células foram lavadas 2 vezes com 10 mL de PBS e ressuspensas em 10 mL de meio de cultura suplementado com SFB. As suspensões foram transferidas para tubos e centrifugadas a 1500 g por 5 min a 10°C. Os sobrenadantes foram removidos e os precipitados celulares ressuspensos em 10 mL de PBS com auxílio de pipeta Pasteur.

Foi feita nova centrifugação a 1500 g por 5 min a 10°C, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspenso em 250 μL de PBS.

Em seguida, as células foram lisadas e desproteinizadas com adição de 250 μL da solução A. As suspensões foram centrifugadas a 8000 g por 5 min a 10°C e os sobrenadantes foram utilizados para dosagem de NPSH, enquanto os precipitados foram utilizados para dosagem de proteínas.

Para a dosagem de NPSH, 200 μL de sobrenadante foram neutralizados pela adição de 62 μL da solução B e 800 μL da solução C. O volume de 1 mL dessa solução foi transferido para uma cubeta e foram adicionados 7 μL da solução de DTNB. A absorbância a 412 nm, devida à formação de 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), foi verificada 1 minuto após a adição de DTNB: 2GSH + DTNB → GSSG + 2 TNB.

A concentração de NPSH foi determinada utilizando-se um coeficiente de extinção molar de 13600 $M^{-1}cm^{-1}$ (Ellman, 1959). A concentração proteica do precipitado foi determinada pelo método de Bradford. A concentração de NPSH foi expressa por μg de proteína.

3.8 - Dosagem de proteínas (método de Bradford)

Reagente para dosagem: 100 mg de azul brilhante de coomassie G-250 dissolvidos em 50 mL de etanol 95%. A essa solução foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85% (p/v). A solução resultante foi diluída para o volume final de 1 litro. Solução A: 0,15 M NaCl. Solução B: 300 mM NaOH.

O método consiste na observação de que o azul brilhante de coomassie G-250 existe em duas cores diferentes: vermelho e azul. A forma vermelha é convertida para a forma azul após ligação à proteína. O complexo é formado rapidamente (2 min), permanece disperso em solução por um tempo relativamente longo (1 h) e tem um alto coeficiente de extinção, o que permite grande sensibilidade na dosagem das proteínas (Bradford, 1976).

A curva-padrão para dosagem das proteínas foi construída utilizando-se albumina de soro bovino (10 a 100 μg de albumina em 100 μL de solução). As soluções de proteína foram preparadas na solução A. Aos tubos contendo 100 μL de solução de proteína foram adicionados 5 mL da solução para dosagem. Após agitação, a absorbância a 595 nm foi medida em cubetas de 3 mL contra o branco contendo 100 μL da solução A e 5 mL da solução para dosagem. Uma curva padrão foi elaborada para determinação do conteúdo de proteínas em amostras desconhecidas.

Para a dosagem de proteínas nas amostras, os precipitados foram ressuspensos em 400 μL da solução B. As soluções de proteínas foram preparadas juntando-se 20 μL de cada amostra com 80 μL da solução A. Às soluções resultantes foram adicionados 5 mL da solução para dosagem e a leitura da absorbância feita como descrito acima.

3.9 - Tratamento dos ratos com solução de Fe-NTA

Ratos *Wistar* com 3 meses de idade foram tratados com injeção intraperitonial de solução de 10 mg Fe/kg (Fe-NTA). Os animais, 40 ratos, foram divididos em quatro grupos: 10 ratos para controle tratados com salina, 5 para tratamento com Fe-NTA por 24 h e 5 para o tratamento com Fe-NTA por 3 h; 10 ratos foram pré-tratados com 10 mg/kg de licopeno por 5 dias; 10 foram pré-tratados com solução de β-caroteno, 10 mg/kg, durante cinco dias. Posteriormente tanto o grupo pré-tratado com o licopeno quanto o pré-tratado com β-caroteno foram submetidos ao tratamento com a solução de Fe-NTA divididos nos 4 grupos seguintes: 10 ratos, 5 pré-tratados com o licopeno e 5 pré-tratados com o β-caroteno, foram tratados com Fe-NTA por 24 h. Outros 10 ratos, 5 pré-tratados com o licopeno e 5 pré-tratados com o β-caroteno foram tratados com Fe-NTA por 3 h.

Após estes tratamentos, os animais foram anestesiados com éter e os órgãos: próstata, fígado, pulmão e rim, foram retirados por incisão cirúrgica. Partes dos órgãos foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a –85°C para análise de malonaldeído, extração de DNA para análise de 8-oxo-dGuo e preparo de lâminas para análises histológicas.

3.10 - Administração de carotenóides

Os carotenóides são fotossensíveis e facilmente oxidados. As soluções estoque de licopeno e β-caroteno foram preparadas na concentração de 50 mg/mL de Tween. O licopeno e o β-caroteno foram triturados em 1 mL de Tween 80, na temperatura ambiente, obtendo-se

uma pasta. Solução salina foi adicionada e as soluções foram homogeneizadas em vórtex até a concentração final de 5 mg/mL de suspensão. As soluções, 0,2 mL, foram injetadas intraperitonialmente nos ratos (Forsberg e col., 1959). Experimentos foram realizados com grupo de animais recebendo apenas o veículo (Tween).

3.11 - Isolamento do DNA

A extração do DNA genômico foi feita usando o método caotrópico com NaI (Wang e col., 1994) com algumas modificações. Aproximadamente 100 mg ou (~ 1 x 10^6 células) de tecido (fígado, rim, pulmão e próstata) foi homogeneizado com 2 mL de solução de lise (1% (p/v) Triton X100, 0,32 M sacarose, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5). Centrifugou-se a 1500 g por 10 min, o precipitado foi suspenso em 600 µL de 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, contendo 5 mM EDTA e 0,15 mM desferroxamina. Adicionou-se 30 µL de RNAse 1 mg/mL e 8 µL de RNAse T1, 1000 U/mL, em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4, contendo 1 mM de EDTA e 2,5 mM desferroxamina. Incubou-se por 1 h a 37° C. Adicionou-se 30 µL de proteinase K (20 mg/mL) e a mistura foi novamente incubada por 1 h a 37° C. Centrifugou-se a 5000 g por 15 min a fase líquida foi coletada e 1,2 mL de NaI 7,6 M foi adicionado, seguido da adição de 1 mL de isopropanol. Agitou-se bem e coletou-se o precipitado. Lavou-se o precipitado centrifugando por 15 min com 1 mL de isopropanol 40% seguido de lavagem com etanol a 70%. O DNA foi solubilizado em 100 µL de desferroxamina 0,1 mM e a concentração foi medida

espectrofotometricamente a 260 nm. A pureza foi analisada usando a relação A_{260}/A_{280} > 1,75. O DNA (100 µg) foi diluído em 200 µL de água deionizada. Adicionou-se 4 µL de tampão acetato 1 M, pH 4,8, com 5 unidades de nuclease P1 e incubou-se a 37° C por 30 min. Adicionou-se 150 µL de Tris–HCl 1 M, pH 7,4, 3 unidades de fosfatase alcalina seguido de incubação a 37° C por 1 h. A amostra foi centrifugada e a fase aquosa foi coletada para análise via HPLC.

Possíveis contaminações de proteínas nos ácidos nucléicos foram descartadas por medidas utilizando-se o método de Bradford.

3.12 - Hidrólise enzimática

O DNA extraído das células foi hidrolisado enzimaticamente para subseqüente análise por HPLC. Para a hidrólise, foi utilizado o procedimento descrito abaixo.

Um total de 1 mg de DNA foi dissolvido em 1 mL de tampão acetato de sódio 20 mM, pH 4,8. Em seguida, foi adicionada nuclease P1 (10 unidades para cada 100 µg de DNA) e a amostra foi incubada a 37°C por 4 h. Então, foram adicionados 150 µL de tampão Tris-HCl 1M, pH 7,4 para cada 1 mL de solução e 15 unidades de fosfatase alcalina para cada 1 mg de DNA. A amostra foi incubada a 37°C por 2 horas, filtrada e alíquotas do DNA hidrolisado foram submetidas à análise por HPLC (Fiala e col., 1989).

3.13 - Análise de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dGuo) por HPLC por detecção eletroquímica

Foi utilizado um sistema de HPLC, consistindo de uma bomba 625LC e injetor Rheodyne modelo 9125-080, com detectores fotodiodos WATERS 991 e detector coulométrico ESA, cela analítica modelo 5010, acoplado a um sistema de aquisição de espectros NEC Power Mate SX Plus. A separação foi obtida em uma coluna de fase reversa C18 Supelco (25 cm X 4,6 mm), eluída com 50 mM KH_2PO_4, pH 5,5 contendo 6% de metanol a 0,6 mL/min.

3.14 - Determinação do malonaldeído como indicador de lipoperoxidação

Aproximadamente 300 mg de fígado, próstata, rim e pulmão, foram pesados e homogeneizados com 1 mL de tampão TRIS-HCl 30 mM, pH 7,4. Adicionou-se 1 mL de acetonitrila e centrifugou-se por 10 minutos a 4000 rpm. Filtrou-se com filtro de 0,22 µm e 100 µL do filtrado foi injetado no HPLC. A separação ocorreu em uma coluna S-5 Spherisorb-NH_2 com um fluxo de 0,5 mL/min de tampão Tris-HCl contendo 20% de acetonitrila. O malonaldeído foi monitorado pela medida da absorbância a 267 nm. A quantificação do malonaldeído nas amostras, foi feita com o auxílio de curva de calibração elaborada a partir de uma solução estoque de MDA 10 mM (Esterbauer e col., 1990).

3.15 - Extração de carotenóides dos órgãos

Aproximadamente 300 mg de cada órgão (fígado, próstata, rim e pulmão) foram triturados, em seguida, foi adicionado THF e a mistura foi homogeneizada e sonicada. Depois de 5 extrações com THF, a mistura foi seca em atmosfera de N_2 e o resíduo foi tratado com 10% de KOH metanólico dentro de atmosfera de N_2 por 1h à temperatura ambiente para remoção de lipídios. O licopeno foi extraído com 1,5 mL de NaCl (10%), 2 mL de metanol e 1,5 mL de diclorometano. O sobrenadante (fase orgânica) foi removido no escuro e seco em atmosfera de nitrogênio a 30 °C. O resíduo foi ressuspenso em 200 μL de fase móvel e a concentração do licopeno foi analisada via HPLC usando um equipamento Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japan). Este inclui duas bombas LC-10AD, um injetor Rheodyne e um detector photodiode array (SPD-M10AV), controlado por um módulo de comunicação (CBM-10A) com um software CLASS LC-10AWS. A separação isocrática ocorreu com uma coluna (Spherex, 250 x 4.6 mm, 5 μm) tendo usado como fase móvel acetonitila: THF: metanol (68:22:10 v/v/v), com 0,025%(p/v) de acetato de amônio, com um fluxo de 1 mL/min. O licopeno e o β-caroteno foram detectados pela absorbância de 460 nm (Zhao e col., 1998).

3.16 - Procedimento histológico

Para o estudo histológico (300 mg) os tecidos foram fixados. O rim foi fixado em Bouin (aldeído fórmico 38%, 250 mL, ácido acético, 5 mL, ácido pícrico solução aquosa saturada, 750 mL) por 12 h; e a próstata, o fígado e o pulmão foram fixados em 10% formol tamponado, por 24 h; para posterior preparo das lâminas com suas colorações específicas: Hematoxilina e eosina (HE), Perls (ferrocianeto de potássio 1g, ácido clorídrico solução aquosa 13%), específica para ferro. Sudam IV para gordura, PAS (ácido periódico-schiff) para mucopolissacarídeos. As lâminas foram analisadas em colaboração com a patologista Profa. Dra. Vera Capelozzi da Faculdade de Medicina da USP. Os tecidos foram embebidos em parafina e cortados em fatias para coloração com H&E. Para detecção da gordura, fatias de 3 μm de fígados, rim, pulmão e próstata foram congeladas e coloridas com Sudan IV, gerando uma coloração vermelha para os lipídios presentes. Para detectar os depósitos de ferro presentes nos hepatócitos, células renais, células pulmonares e células de próstatas, fatias de 5 μm de fígado, rim, pulmão e próstata foram embebidas em parafina e submetidas à coloração com azul da prússia.

1. Parâmetros relatados para microarquitetura e forma

- desorganização da estrutura do parênquima

2. Parâmetros relatados para injúria hepática e renal

- degeneração em balão, esteatoses, necroses e regeneração

3. Parâmetros relatados para deposição de pigmentos e acúmulo intracelular

- ferro e lipídios

Estes parâmetros foram semi-quantificados por um escore histológico de acordo com a extensão da severidade das lesões histológicas presentes no tecido examinado:

- 0: ausência de lesões;
- 1: presença de lesões em 1% até 25%;
- 2: presença de lesões em 26% até 50%;
- 3: presença de lesões em 51% até 75%;
- 4: presença de lesões em 76%até 100%.

3.17 - Biodisponibilidade do β-caroteno e do licopeno

3.17.1 - Canulação dos ratos

Um catéter de polietileno foi introduzido na artéria carótida esquerda dos ratos, previamente anestesiados com éter. O catéter foi exteriorizado entre as escápulas e preenchido com uma solução salina e heparina 500 U/mL. Após um período de recuperação de 4 a 6 dias, os ratos foram colocados em gaiolas individuais, com total liberdade de movimentação, para permitir as coletas de sangue pela cânula. Retirou-se 1 mL de sangue dos ratos após 3, 6, 9, e 24 h da aplicação dos carotenóides. Amostras de

sangue de ratos "controle", ou seja, ratos que não receberam carotenóides, também foram analisadas.

3.17.2 - Coleta de sangue por incisão na cauda

Os ratos, exceto grupos controle, receberam licopeno ou β-caroteno, após 3, 6, 9 e 24 h da inoculação dos carotenóides nos ratos, amostras de sangue foram coletadas (1 mL) por incisão na cauda como descrito a seguir:

Os ratos foram colocados em uma estufa, com a porta aberta, a uma temperatura variável de 36 a 42°C durante 15 min sob observação; este procedimento é realizado para se estimular a circulação sanguínea dos ratos, facilitando assim a coleta do sangue. Um a um, os ratos foram sendo colocados dentro de um tubo feito de PVC, contendo furos para sua respiração e um orifício por onde se passava a cauda, ficando assim impossibilitados de se movimentar. A coleta do sangue (1 mL) foi feita atavés de uma pequena incisão na cauda.

3.17.3 - Preparo das amostras de sangue

O sangue recolhido em tubo com anticoagulante foi centrifugado à 3000 rpm por 5 min. O plasma sanguíneo foi recolhido. À 250 μL de plasma foram adicionados 250 μL de etanol e 500 μl de hexano. As amostras foram agitadas por 1 min no vórtex e então levadas à centrífuga por 5 minutos a 2500 rpm. Além das proteínas do plasma, observaram-se

duas fases, uma delas bem límpida que foi então removida. Esta fase foi seca sob nitrogênio e em seguida adicionou-se 10 μL de uma solução 5 mM de β-ionona utilizada como padrão interno e ainda 40 μL da fase utilizada para injeção no HPLC. Alíquota de 20 μL foram injetadas no HPLC utilizando-se o sistema: Coluna C-18 (250 X4,6 mm, 5 μm), fluxo: 1 mL/min. Solvente: 68% ACN, 22% THF, 10% MeOH e 0,025% NH_4Ac, modo isocrático; tempo da corrida: 20 min (Lowe e col., 1999; Riso e col., 1999).

3.17.4 - Separação de linfócitos

Adiciona-se 10 mL de ficoll-paque em um tubo de centrífuga, com cuidado, coloca-se 10 mL de sangue diluído em solução salina. Centifuga-se a 400 g por 30 – 40 min à 18 – 20°C. Descarta-se a fase superior e retira-se a camada subseqüente (linfócitos). Transfere-se para um outro tubo, adiciona-se 6 mL de solução salina homogeneiza-se e centrifuga-se a 60 – 100 g por 10 min à 18 – 20° C. Ressuspende-se os linfócitos em 6 mL de salina e torna-se a centrifugar a 60 – 100 g por 10 min à 18 – 20° C. Remove-se o sobrenadante e promove-se a extração do DNA com o precipitado celular.

4 - RESULTADOS

4.1 – Efeito de licopeno em células em cultura

4.1.1 - Nível de licopeno em células

A determinação da concentração (picomolar) do licopeno foi realizada em células que foram tratadas com licopeno dissolvidos em THF. A concentração de licopeno nas células foi determinada depois de 2 h de incubação com a solução de licopeno (2,6 ± 0,6 μM). O valor reprodutível de três experimentos independentes em que as células foram expostas à solução de licopeno foi de 20 ± 6 pmol /10^6 células. Não foi detectado licopeno nas células controle (dados não mostrados).

4.1.2 - Relação entre formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e sulfidrilas não-protéicas em células tratadas com Fe-NTA

Tratamentos com Fe-NTA em presença de ascorbato causaram substancial lipoperoxidação em células CV1-P, como monitorado pela formação de TBARS (**Tabela IV**). As maiores concentrações de TBARS foram observadas depois que as células foram tratadas com Fe-NTA e ascorbato (40 μM) por 1 h. O tempo de formação de TBARS está correlacionado com a depleção máxima dos compostos de NP-SH. Um aumento na lipoperoxidação com um concomitante decréscimo hepático

de glutationa já foi descrito anteriormente depois de tratamento com Fe-NTA em ratos(Igbal e col., 1995). As células suplementadas com licopeno mostraram uma inibição de 86% na formação de TBARS depois do tratamento de 2 h com Fe-NTA/ascorbato (**Tabela IV**). O licopeno foi portanto capaz de evitar quase que completamente os danos à membrana induzidos por Fe-NTA/ascorbato.

4.1.3 - Redução da formação de 8-oxodGuo em DNA de células por licopeno

Danos oxidativos induzidos por Fe-NTA são já bem conhecidos (Umemura e col., 1990; Yamaguchi e col., 1996). Usando um método sensível para detectar 8-oxodGuo por HPLC-ED, o nível basal de 8-oxodGuo no DNA das células controle foi de **1,6 ± 0,09 resíduos/10^6 dGuo.** Depois do tratamento com Fe-NTA/ascorbato foi de **14 ± 0,4 resíduos/10^6 dGuo.** Portanto, o nível de 8-oxodGuo no DNA das células tratadas com Fe-NTA/ascorbato foi 8,8 vezes significativamente mais alto para $p<0,001$, quando comparado com o grupo controle. As células suplementadas anteriormente com licopeno e tratadas posteriormente com Fe-NTA/ascorbato por 2 h mostraram uma redução de 77% no nível de 8-oxodGuo **3,2± 0,4 resíduos/10^6 dGuo** (**Tabela V**).

4.2 – Efeito de carotenóides em tecidos de ratos

4.2.1 - Concentração de licopeno em fígado de ratos

Os ratos (12 semanas) receberam diariamente injeções *i.p.* de licopeno ou β-caroteno, 10 mg/kg de massa corpórea, por cinco dias consecutivos. No último dia de tratamento os animais foram sacrificados e a concentração de licopeno e β-caroteno no fígado foram determinadas. Os valores reprodutíveis de licopeno de cinco fígados foram **23,4 ± 3,9 nmol/g tecido** para o grupo tratados apenas com licopeno de **21,9 ± 6,3 nmol/g de tecido** para grupo com pré-tratamento com licopeno por 5 dias e posterior tratamento com Fe-NTA por 3 h e de **25,5 ± 10,8 nmol/g de tecido** para o grupo com pré-tratamento por 5 dias e posterior tratamento com Fe-NTA por 24 h. Licopeno não foi detectado no fígado do grupo controle (resultados não mostrados). Os valores para o grupo tratado apenas com β-caroteno por 5 dias foi de **10,1± 1,6 nmol/g de tecido.** Para o grupo com pré-tratamento com β-caroteno por 5 dias e posterior tratamento com Fe-NTA por 3 h foi de **1,3 ± 0,6 nmol/g de tecido** e de **3,9 ± 0,8 nmol/g de tecido** para o grupo com pré-tratamento com β-caroteno por 5 dias e posterior tramento com Fe-NTA por 24 h. β-caroteno não foi detectado no fígado do grupo controle (resultados não mostrados) **(Tabela VI)**

4.2.2 - Concentração de malonaldeído (MDA) em fígado de ratos tratados com Fe- NTA

O tratamento com Fe-NTA causou um aumento na lipoperoxidação em fígado de ratos, quando monitorado pela formação de MDA (**Tabela VII**). Altas concentrações de MDA foram observadas depois do tratamento com Fe-NTA por 3h **(521 ± 26 nmol/g de tecido)** e após o tratamento com Fe-NTA 24 h **(578 ± 61 nmol/g tecido)**. Nos grupos de ratos suplementados com licopeno por 5 dias e posteriormente tratados com Fe-NTA por 3 h as concentrações foram de **323 ± 28 nmol/g de tecido** e para o tratamento com Fe-NTA 24 h obtivemos concentrações de **347 ± 26 nmol/g de tecido.** Para os grupos suplementados com β-caroteno e tratados com Fe-NTA obtivemos concentrações de MDA de **367 ± 36 nmol/g de tecido** para o tratamento com Fe-NTA por 3 h e de **357 ± 21 nmol/g de tecido** para o tratamento com Fe-NTA por 24 h. O licopeno e o β-caroteno portanto previniram os danos oxidativos em membranas induzidas por Fe-NTA. A concentração de MDA no grupo controle foi de **330 ± 31 nmol/g de tecido** (**Tabela VII**).

4.2.3 - Redução da formação de 8-oxodGuo em DNA de fígado de rato tratados com licopeno ou β-caroteno

A concentração de 8-oxodGuo detectados por HPLC-ED em DNA de fígado de animais do grupo controle foi **2,3 ± 0,06 resíduos/10^6 dGuo**. Quando os animais foram submetidos ao tratamento com Fe-NTA, a

concentração aumentou 4 vezes ($p < 0.0005$) após o tratamento com Fe-NTA por 3 h (**9,3 ± 2,0 resíduos/10^6 dGuo)** e 4,8 vezes, ($p<0.0005$) depois do tratamento com Fe-NTA por 24 h (**11,1 ± 1,5 resíduos/10^6 dGuo)**. No grupo de ratos pré-tratados por 5 dias com licopeno ou com β-caroteno e tratados posteriormente por 3 h e 24 h com Fe-NTA, verificam-se reduções nas concentrações de 8-oxodGuo atingindo a mesma concentração observada nas amostras do grupo controle (**Tabela VIII**).

4.2.4 - Alterações histológicas no fígado

A presença de injúria hepática em fígados de ratos tratados com Fe-NTA foi revelada por estudos histológicos. A micro-arquitetura do fígado evoluiu para a configuração lobular e acinar depois do tratamento com Fe-NTA, normalmente os hepatócitos apresentam uma configuração cribiforme e anatomástica. Entretanto, a forma e o aspecto adquiridos pelos hepatócitos depois do tratamento com Fe-NTA evoluíram para uma leve degeneração em balão e esteatose, culminando em uma severa necrose induzida pelo tratamento com Fe-NTA por 3 e 24 horas. A **Figura 10** mostra a evolução temporal da necrose depois de 3 h (Fig. 10, painel A) e 24 h (Fig. 10, painel B) depois do tratamento com Fe-NTA e a prevenção com o pré-tratamento com licopeno e com o β-caroteno por 5 dias e posterior tratamento com Fe-NTA por 3 e 24 h (painel C). A evolução temporal da degeneração lipídica no tecido hepático é mostrada na **figura 11** (Fig. 11, painéis E até H). Uma visão da degeneração lipídica é mostrada no painel E depois do tratamento com Fe-NTA por 3 h. Os

hepatócitos mostram uma intensa degeneração lipídica depois do tratamento com Fe-NTA por 24 h (Fig. 11. painel F) contrastando com uma uniforme coloração citoplasmática dos hepatócitos após o pré-tramento com licopeno ou com o β-caroteno por 5 dias e posterior tratamento com Fe-NTA (Fig. 11 painel G). A evolução temporal do Fe-NTA induzindo degeneração lipídica, visualizada por coloração com Sudam IV, é mostrada na **Figura 12**. Depois do tratamento com Fe-NTA por 3 h é possível ver um pequeno aumento de degeneração lipídica (Fig. 12, painel I). No entanto, depois do tratamento com Fe-NTA por 24 h ocorre uma maior deposição de lipídio (Fig. 12, painel J). Com o pré-tratamento com licopeno ou com o β-caroteno por 5 dias e posterior tratamento com Fe-NTA por 3 e 24 h, verificamos a prevenção nos depósitos de lipídios nos hepatócitos (Fig. 12, painel K). Os dados da análise semi-quantitativa dos estudos histológicos estão resumidos na **Tabela IX**.

4.2.5 - Concentração de licopeno e de β-caroteno em rim de ratos

Os ratos (12 semanas) receberam diariamente injeções *i.p.* de licopeno ou de β-caroteno, 10 mg/kg de massa corpórea, por cinco dias consecutivos. No último dia de tratamento os animais foram sacrificados e a concentração de licopeno e de β-caroteno foram determinada nos rins. Os valores reprodutíveis de licopeno em cinco rins foram **0,13 ± 0,04 nmol/g tecido**. Licopeno não foi detectado nos rins do grupo controle (resultados não mostrados). Os valores para o grupo tratado com β-caroteno por 5 dias foram de **0,30 ± 0,08 nmol/g tecido**. β-Caroteno não

foi detectado nos rins do grupo controle (resultados não mostrados) (**Tabela X**).

4.2.6 - Concentração de MDA em rim de ratos Wistar tratados com Fe- NTA

O tratamento com Fe-NTA causou um aumento da lipoperoxidação em rins de ratos, como mostrado pela formação de MDA. Uma alta concentração de MDA **114 ± 34 nmol/g de tecido** foi observada depois do tratamento com Fe-NTA por 3 h e de **199 ± 37 nmol/g tecido** para o tratamento com Fe-NTA 24 h. Nos grupos de ratos suplementados com licopeno por 5 dias e posteriormente tratados com Fe-NTA por 3 h a concentração de MDA foi de **64 ± 17 nmol/g de tecido** e para o tratamento com Fe-NTA por 24 h foi de **55 ± 15 nmol/g de tecido.** Nos grupos suplementados com β-caroteno e tratados com Fe-NTA por 3 h obtivemos concentrações de MDA de **77 ± 16 nmol/g de tecido** e concentrações de **74 ± 16 nmol/g de tecido** para tratamento com Fe-NTA 24 h. O licopeno e o β-caroteno evitaram os danos oxidativos em membranas induzidos por Fe-NTA. A concentração de MDA no grupo controle foi de **62 ± 12 nmol/g de tecido.** A concentração de MDA no grupo suplementado apenas com licopeno foi de **63 ± 10 nmol/g de tecido** e para o grupo suplementado apenas com β-caroteno foi de **67 ± 13 nmol/g de tecido** (**Tabela XI**).

4.2.7 - Redução da formação de 8-oxodGuo em DNA de rim de ratos suplementados com licopeno ou com o β-caroteno

A concentração de 8-oxodGuo em DNA de rins de ratos do grupo controle foi **0,7 ± 0,03 resíduos/10^6 dGuo**. Quando os animais foram submetidos ao tratamento com Fe-NTA, a concentração aumentou 7,6 vezes ($p < 0.005$) depois do tratamento com Fe-NTA por 3 h (**5,3 ± 0,6 resíduos/10^6 dGuo)** e 8,7 vezes ($p<0.005$) depois do tratamento com Fe-NTA por 24 h (**6,1 ± 0,8 resíduos/10^6 dGuo)**. Nos grupos de ratos pré-tratados por 5 dias com licopeno ou β-caroteno e posteriormente submetidos aos tratamentos com Fe-NTA, verificou-se reduções nas concentrações de 8-oxodGuo ao nível do grupo controle, (**1,5 ± 0,3 e 1,2 ± 0,2 resíduos/10^6 dGuo)** para os grupos pré-tratados com licopeno e submetidos ao tratamento com Fe-NTA por 3 e 24 h respectivamente. Para o grupo de ratos pré-tratados com β-caroteno e posteriormente tratados com Fe-NTA por 3 e 24 h as concentrações obtidas foram **1,3 ± 0,12 e 0,98 ± 0,15 resíduos/10^6 dGuo** respectivamente (**Tabela XII**).

4.2.8 - Alterações histológicas no rim

A presença de injúria em células renais de ratos tratados com Fe-NTA foi revelada por estudos histológicos. A micro-arquitetura do rim apresenta o padrão usual depois do tratamento com Fe-NTA. Entretanto, a forma e o aspecto adquiridos pelas células renais depois do tratamento com Fe-NTA foi de uma pequena degeneração em balão, culminando em

uma severa necrose induzida pelo tratamento com Fe-NTA por 3 e 24 horas. A **Figura 13** mostra a evolução da degeneração em balão nos túbulos proximais. No painel B (**Figura 13**) é mostrado um glomérulo normal, adjacente a degeneração em balão e necrose hialina no epitélio de um túbulo proximal, que é mais pronunciado no painel C e D depois do tramento com Fe-NTA por 24 h, podem ser verificados também nos painéis A e B depois do tratamento com Fe-NTA por 3 horas. Também na Figura 13 é possível vislumbrar o acúmulo intralumial de ácido mucopolissacarídeo, que variam de uma visualização focal (painel F) para uma visualização difusa (painel E). A **Figura 14** (painéis A – F) representa o padrão histológico depois do pré-tratamento com licopeno ou β-caroteno e posterior tratamento com Fe-NTA por 3 e 24 h. Genericamente, observamos uma menor extensão dos danos, degeneração em balão e necrose hialina, e uma menor severidade da injúria renal; o painel A mostra a presença de um glomérulo preservado (seta), contrastando com o o aumento das característica tintorias nuclear e citoplasmática devido a regeneração do epitélio (ponta da seta) e o decréscimo da degeneração em balão observadas no painel B. Entretanto, alguns túbulos proximais mostrados nos painéis C e D, ainda apresentam sinais de necrose hialina. A remodelação da histoarquitetura renal pode ser melhor observada nos painéis E e F depois da coloração com PAS. A **Figura 15** ilustra de maneira geral (painéis A – D) a preservação da histoarquitetura renal vislumbrada num menor aumento, com o pré-tratamento com os carotenóides e posterior tratamento com Fe-NTA por 3 e 24 h. Igualmente ilustrativos são os aspectos histopatológicos encontrados em visão

panorâmica (Figura 16, painéis A - D) dos efeitos da agressão renal induzida por Fe-NTA. Nota-se o aumento das características tintoriais núcleo/citoplamáticas no epitélio proximal (painel A – D) decorrentes da necrose hialina e a vacuolização difusa pela degeneração hidrópica. Os dados da análise semi-quantitativa dos estudos histológicos estão resumidos na **Tabela XIII** que mostram a evolução temporal da necrose hialina e degeneração em balão depois de 3 e 24 h do tratamento com Fe-NTA. No pré-tratamento com licopeno e com o β-caroteno por 5 dias e posterior tratamento com Fe-NTA por 3 e 24 h, verificamos a redução da necrose hialina e da degeneração em balão.

4.2.9 - Concentração de licopeno e de β-caroteno em pulmão de ratos

Os ratos (12 semanas) receberam diariamente injeções *i.p.* de licopeno ou de β-caroteno, 10 mg/kg de massa corpórea, por cinco dias consecutivos. No último dia de tratamento os animais foram sacrificados e as concentrações de licopeno e de β-caroteno foram determinadas nos pulmões. Os valores de licopeno em cinco pulmões foram **0,64 ± 0,2 nmol/g tecido**. Licopeno não foi detectado nos pulmões dos ratos do grupo controle (resultados não mostrados). Os valores para o grupo tratado com β-caroteno por 5 dias foram de **0,17 ± 0,05 nmol/g tecido**. β-caroteno não foi detectado nos pulmões dos ratos do grupo controle (resultados não mostrados) (**Tabela XIV**).

4.2.10 - Concentração de MDA em pulmão de ratos tratados com Fe- NTA

Um aumento na concentração de MDA (**215 ± 28 nmol/g de tecido)** foi observado depois do tratamento com Fe-NTA 3 e 24 h (**458 ± 77 nmol/g de tecido).** Nos grupos de ratos suplementados com licopeno por 5 dias e posteriorrmente tratados com Fe-NTA por 3 h a concentração de MDA foi de **142 ± 17 nmol/g de tecido.** Para o tratamento com Fe-NTA por 24 h a concentração de MDA foi de **139 ± 15 nmol/g de tecido.** Nos grupos suplementados com β-caroteno e tratados com Fe-NTA por 3 h obtivemos concentrações de MDA de **117 ± 16 nmol/g de tecido.** Concentrações de **124 ± 19 nmol/g de tecido** foram obtidos para tratamento com Fe-NTA 24. Portanto o licopeno e β-caroteno evitaram os danos oxidativos em membranas induzidos por Fe-NTA. A concentração de MDA no grupo controle foi de **135 ± 25 nmol/g de tecido.** A concentração de MDA no grupo suplementado apenas com licopeno foi de **123 ± 15 nmol/g de tecido** e para o grupo suplementado apenas com β-caroteno foi de **137 ± 13 nmol/g de tecido** (**Tabela XV**).

4.2.11 - Redução da formação de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de ratos suplementados com licopeno ou com o β-caroteno

A concentração de 8-oxodGuo em DNA de pulmões de ratos do grupo controle foi **0,6 ± 0,07 resíduos/10^6 dGuo**. Quando os animais foram submetidos ao tratamento com Fe-NTA, a concentração aumentou 4

vezes ($p < 0,005$) depois do tratamento com Fe-NTA por 3 h (**2,5 ± 0,1 resíduos/10^6 dGuo)** e 3,6 vezes ($p<0,005$) depois do tratamento com Fe-NTA por 24 h **(2,2 ± 0,2 resíduos/10^6 dGuo)**. Nos grupos de ratos pré-tratados por 5 dias com licopeno ou β-caroteno e posteriormente submetidos aos tratamentos com Fe-NTA foram verificadas reduções nas concentrações de 8-oxodGuo ao nível observado no grupo controle **0,4 ± 0,1 e 0,6 ± 0,15 resíduos/10^6 dGuo** para os grupos pré-tratados com licopeno e submetidos ao tratamento com Fe-NTA por 3 e 24 h respectivamente. Para os grupos pré-tratados com β-caroteno e posteriormente tratados com Fe-NTA por 3 e 24 h as concentrações obtidas foram de **0,6 ± 0,1 e 0,71 ± 0,08 resíduos/10^6 dGuo** respectivamente (**Tabela XVI**).

4.2.12 - Concentração de licopeno e de β-caroteno em próstata de ratos

Os ratos (12 semanas) receberam diariamente injeções *i.p.* de licopeno ou de β-caroteno, 10 mg/kg de massa corpórea, por cinco dias consecutivos. No último dia de tratamento os animais foram sacrificados e a concentração de licopeno e de β-caroteno foram determinadas nas próstatas. Os valores reprodutíveis de licopeno em próstatas de cinco animais tratados com licopeno foram **0,51 ± 0,04 nmol/g tecido**. Licopeno não foi detectado nas próstatas do grupo controle (resultados não mostrados). Os valores para o grupo tratado com β-caroteno por 5 dias

foram de **0,13 ± 0,01 nmol/g tecido**. β-Caroteno não foi detectado nas próstatas do grupo controle (resultados não mostrados) (**Tabela XVII**).

4.2.13 - Concentração de MDA em próstata de ratos Wistar tratados com Fe- NTA

O tratamento com Fe-NTA causa um aumento da lipoperoxidação em próstata de ratos como verificado pela formação de MDA. Uma alta concentração de MDA (**817 ± 122 nmol/g de tecido)** foi observada depois do tratamento com Fe-NTA por 3h e para o tratamento com Fe-NTA 24 h (**1176 ± 57 nmol/g tecido)**. Nos grupos de ratos suplementados com licopeno por 5 dias e posteriormente tratados com Fe-NTA por 3 h a concentração de MDA foi de **364 ± 17 nmol/g de tecido** e para o tratamento com Fe-NTA por 24 h foi de **355 ± 35 nmol/g de tecido.** Nos grupos suplementados com β-caroteno e tratados com Fe-NTA por 3 h as concentrações de MDA obtidas foram de **377 ± 36 nmol/g de tecido** e concentrações de **374 ± 26 nmol/g de tecido** foram obtidas para tratamento com Fe-NTA 24 h. O licopeno e β-caroteno evitaram eficientemente os danos oxidativos em membranas induzidos por Fe-NTA. A concentração de MDA no grupo controle foi de **359 ± 32 nmol/g de tecido.** A concentração de MDA no grupo suplementado apenas com licopeno foi de **363 ± 30 nmol/g de tecido.** Para o grupo suplementado apenas com β-caroteno as concentrações observadas foram de **367 ± 13 nmol/g de tecido** (**Tabela XVIII**).

4.2.14 - Redução da formação de 8-oxodGuo em DNA de próstata de ratos suplementados com licopeno ou com o β-caroteno

A concentração de 8-oxodGuo em DNA de próstatas do grupo controle foi **1,7 ± 0,3 resíduos/10^6 dGuo**. Quando os animais foram submetidos ao tratamento com Fe-NTA a concentração aumentou 3,7 vezes ($p < 0.005$) depois do tratamento com Fe-NTA por 3 h (**6,3 ± 0,6 resíduos/10^6 dGuo)**. Nos grupos de ratos pré-tratados por 5 dias com licopeno ou com o β-caroteno e posteriormente submetidos aos tratamentos com Fe-NTA, foram verificadas reduções nas concentrações de 8-oxodGuo atingindo o nível do grupo controle (**1,8 ± 0,3 resíduos/10^6 dGuo)** para os grupos pré-tratados com licopeno e submetidos ao tratamento com Fe-NTA por 3 h. Para o grupo pré-tratados com β-caroteno e posteriormente tratados com Fe-NTA por 3 h as concentrações obtidas foram **1,9 ± 0,2 resíduos/10^6 dGuo** respectivamente (**Tabela XIX**).

4.2.15 - Redução da formação de 8-oxodGuo em DNA de linfócitos de ratos suplementados com licopeno ou com o β-caroteno

A concentração de 8-oxodGuo em DNA encontrada em linfócitos de ratos do grupo controle foi **1,8 ± 0,6 resíduos/10^6 dGuo**. Quando os animais foram submetidos ao tratamento com Fe-NTA por 3 h, a concentração aumentou 2,7 vezes (**4,8 ± 0,6 resíduos/10^6 dGuo)** para ($p < 0.005$). Nos grupos de ratos pré-tratados por 5 dias com licopeno ou com o β-caroteno e posteriormente tratados por 3 h com Fe-NTA, foram

vericadas reduções nas concentrações de 8-oxodGuo para **2,0 ± 0,7 resíduos/10^6 dGuo** no grupo pré-tratado com o licopeno e para **1,5 ± 0,1 resíduos/10^6 dGuo** no grupo pré-tratado com o β-caroteno (**Tabela XX**).

TABELA IV

Efeito de licopeno (20 pmol/10^6 células) em mudanças temporais de TBARS e compostos NP-SH em células CV1-P depois do tratamento com Fe-NTA/ascorbato

	TBARS		NP-SH	
	pmol/mg proteína	% de controle	pmol/μg proteína	% do controle
Controle	9,8 ± 3.5	100	10,0 ± 1.0	100
Fe-NTA (30 min)	95,5 ± 6.8*	974		
Fe-NTA (1h)	145,9 ± 16.9*	1489	7,5 ± 1.1*	75
Fe-NTA (2h)	82,4 ± 31.6*	841	8,7 ± 1.7	87
Fe-NTA (3h)	64,5 ± 23.0*	658	10,9 ± 0.9	109
Fe-NTA (1h)+licopeno	11,9 ± 0.9	121	9,6 ± 0.6	96
Fe-NTA (2h)+licopeno	11,4 ± 0.8	116		

Células CV1-P que foram tratadas com (1:4 mM) Fe-NTA/ascorbato (40 μM) em meio DME a 37°C. Resultados são expressos como média ± desvio-padrão de 3 experimentos diferentes. A comparação estatística foi realizada utilizando o Student's *t*-test.* Amostras são significativamente diferentes *$p<0.05$, quando comparadas com o grupo controle.

TABELA V

Efeito de licopeno (20 pmol/10^6 células) na concentração de 8-oxodGuo em DNA células CV1-1P depois do tratamento com Fe-NTA/ascorbato

	8-oxodGuo	
	resíduos/10^6 dGuo	% do controle
Controle	1,6 ± 0.09	100
Fe-NTA (2h)	14,0 ± 0.41*	882
Fe-NTA (2h) + licopeno	3,2 ± 0.41**	204

Células CV1-P foram tratadas por 2 h com (1:4 mM) Fe-NTA/ascorbato (40 μM) em meio DME a 37°C. Resultados são expressos como média ± desvio-padrão de 3 experimentos diferentes. A comparação estatística foi realizada usando o Student's *t*-test. Amostras são significativamente diferentes para *$p < 0.001$, quando comparadas com o grupo controle, ** $p < 0.001$, quando comparadas com o grupo de Fe-NTA.

Tabela VI

Concentração de licopeno e do β-caroteno em fígados de ratos

	Licopeno/β-caroteno (nmol/g tecido)
Licopeno 5 dias	23,4 ± 3
Licopeno + Fe-NTA 3 h	21,9 ± 6 *
Licopeno + Fe-NTA 24 h	25,5 ± 10 *
β-caroteno 5 dias	10.1± 1,6
β-caroteno + Fe-NTA 3 h	1,3± 0,6**
β-caroteno + Fe-NTA 3 h	3,9± 0,8**

Os ratos (12 meses) receberam diariamente, *i.p.*, injeções de licopeno, 10 mg/kg de massa corpórea por cinco dias consecutivos. A comparação estátistica foi feita usando o Student's *t*-test. As amostras não são significativamente diferentes para *$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo Licopeno 5 dias; para **$p < 0.005$, as amostras são significativamente diferentes, quando comparadas com o grupo β-caroteno 5 dias.

TABELA VII

Efeito do licopeno ou β-caroteno nas concentrações de MDA em fígado de ratos depois do tratamento com Fe-NTA

	MDA (nmol/g de tecido)
Controle	330 ± 31
Licopeno(5 dias)	321 ± 17
β-caroteno	349 ± 19
Fe-NTA (3 h)	521 ± 26*
Fe-NTA (24 h)	578± 61*
Fe-NTA (3h) + licopeno	323 ± 28**
Fe-NTA (24h) + licopeno	347 ± 26**
Fe-NTA (3h) + β-caroteno	367 ± 36*
Fe-NTA (24 h) + β-caroteno	357 ± 21*

Cada valor representa a média ± desvio-padrão (n=5 animais) para três experimentos diferentes. Animais tratados com salina +Tween 80 servem como controle. Licopeno ou β-caroteno (10 mg/kg de massa corpórea) foram administrados por cinco dias consecutivos antes do tratamento com Fe-NTA (10 mg/kg massa corpórea). A comparação estatística foi realizada usando o Student's t test. Amostras são significativamente diferentes para *$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo controle, ** $p < 0.005$, quando comparadas com o grupo de Fe-NTA.

Tabela VIII

Efeito de licopeno ou β-caroteno nas concentrações de 8-oxodGuo em DNA de fígado de ratos depois do tratamento com Fe-NTA

	8-oxodGuo
	resíduos/10^6 dGuo
Controle	2,3 ± 0,6
Licopeno 5 dias	2,2 ± 0,8
Fe-NTA 3 h	9,3 ± 2,0*
Fe-NTA 24 h	11,1 ± 0,2*
Fe-NTA 3 h + licopeno	2,6 ± 1,1
Fe-NTA 24 h + licopeno	2,7 ± 1,1**
β-caroteno 5 dias	2,4 ± 0,1
Fe-NTA 3 h + β-caroteno	2,8 ± 0,7
Fe-NTA 24 h + β-caroteno	2,9 ± 0,6**

Cada valor representa a média ± desvio-padrão (n=5 animais) para três experimentos diferentes. Animais tratados com salina+Tween 80 servem como controle. Licopeno e β-caroteno (10 mg/kg de massa corpórea) foram administrados por cinco dias consecutivos antes do tratamento com Fe-NTA (10 mg/kg massa corpórea). A comparação estatística foi realizada usando o Student's t test. Amostras são significativamente diferentes para *$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo controle e **$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo de Fe-NTA.

TABELA IX

Modificações histológicas e acúmulo de ferro e lipídios em fígado de ratos depois do tratamento com Fe-NTA

	Tempo	**Injúria Hepática**			Injúria Metabólica (Acúmulos)	
		Degeneração em balão	Esteatose	Necrose	Lipídios	Ferro
	Fe-NTA 3h	1	1	1	1	1
Fe-NTA	Fe-NTA 24h	4	4	4	3	3
LICOPENO	Fe-NTA 3h	2	0	0	2	1
ou β-cAROTENO	Fe-NTA 24h	1	0	0	1	2

Condições como as descritas em materiais e métodos

Tabela X

Concentração de licopeno e β-caroteno em rim de ratos

	Licopeno/β-caroteno (nmol/g tecido)
Licopeno 5 dias	0,13 ± 0,04
β-caroteno 5 dias	0,30 ± 0,08

Os ratos (3 meses) receberam diariamente, injeções, *i.p,* de licopeno ou β-caroteno, 10 mg/kg de massa corpórea por cinco dias consecutivos.

Tabela XI

Efeito de licopeno ou β-caroteno nas concentrações de MDA em rim de ratos depois do tratamento com Fe-NTA

	MDA (nmol/g tecido)
Controle	62 ± 12
Licopeno 5 dias	63 ± 10
β-caroteno 5 dias	67 ± 13
Fe-NTA 3 h	114 ± 34 *
Fe-NTA 24 h	199 ± 37 *
Fe-NTA 3 h + licopeno	64 ± 17
Fe-NTA 24 h + licopeno	55 ± 15 **
Fe-NTA 3 h + β-caroteno	77 ± 16
Fe-NTA 24h + β-caroteno	74 ± 16 **

Cada valor representa a média ± desvio padrão (n=5 animais) para três experimentos. Animais tratados com salina+Tween 80 servem como controle. Licopeno e β-caroteno (10 mg/kg de massa corpórea) foram administrados por cinco dias consecutivos antes do tratamento com Fe-NTA (10 mg/kg massa corpórea). A comparação estatística foi realizada usando o Student's t test. Amostras são significativamente diferentes para *$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo controle e **$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo de Fe-NTA.

Tabela XII

Efeito de licopeno ou β-caroteno nas concentrações de 8-oxodGuo em DNA de rim de ratos expostos ao tratamento com Fe-NTA

	8-oxodGuo
	resíduos/10^6 dGuo
Controle	0,7 ± 0,03
Fe-NTA 3 h	5,3 ± 0,6*
Fe-NTA 24 h	6,1 ± 0,8*
Fe-NTA 3 h + licopeno	1,5± 0,3
Fe-NTA 24 h + licopeno	1,2 ± 0,2**
Fe-NTA 3 h + β-caroteno	1,3± 0,12
Fe-NTA 24 h + β-caroteno	0,98 ± 0,15**

Cada valor representa a média ± desvio-padrão (n=5 animais) para três experimentos diferentes. Animais tratados com salina+Tween 80 servem como controle. Licopeno e β-caroteno (10 mg/kg de massa corpórea) foram administrados por cinco dias consecutivos antes do tratamento com Fe-NTA (10 mg/kg massa corpórea). A comparação estatística foi realizada usando o Student's t test. Amostras são significativamente diferentes para *$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo controle e **$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo de Fe-NTA.

Tabela XIII

Modificações histológicas em rim de ratos após tratamento com Fe-NTA

	Tempo	Injúria renal	
		Degeneração em balão	Necrose
	Fe-NTA 3h	2	2
Fe-NTA	Fe-NTA 24h	4	4
LICOPENO ou	Fe-NTA 3h	1	2
β-CAROTENO	Fe-NTA 24h	2	2

Condições como descritas em materiais e métodos

Tabela XIV

Concentração de Licopeno e β-caroteno em pulmão de ratos

	Licopeno/β-caroteno (nmol/g tecido)
Licopeno 5 dias	0,64 ± 0,2
β-caroteno 5 dias	0,17 ± 0,05

Os ratos *Wistar* (3 meses) receberam diariamente, injeções, *i.p,* de licopeno ou β-caroteno, 10 mg/kg de massa corpórea por cinco dias consecutivos.

Tabela XV

Efeito de licopeno ou β-caroteno nas concentrações de MDA em pulmão de ratos após tratamento com Fe-NTA

	MDA (nmol/g tecido)
Controle	135 ± 25
Licopeno 5 dias	123 ± 15
β-caroteno 5 dias	137 ± 13
Fe-NTA 3 h	215 ± 28 *
Fe-NTA 24 h	458 ± 77 *
Fe-NTA 3 h + licopeno	142± 17
Fe-NTA 24 h + licopeno	139 ± 15 **
Fe-NTA 3 h + β-caroteno	117± 16
Fe-NTA 24 h + β-caroteno	124 ± 19 **

Cada valor representa a média ± desvio padrão (n=5 animais) para três experimentos diferentes. Animais tratados com salina+Tween 80 servem como controle. Licopeno e β-caroteno (10 mg/kg de massa corpórea) foram administrados por cinco dias consecutivos antes do tratamento com Fe-NTA (10 mg/kg massa corpórea). A comparação estatística foi realizada usando o Student's t test. Amostras são significativamente diferentes para *$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo controle e **$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo de Fe-NTA.

Tabela XVI

Efeito de licopeno ou β-caroteno nas concentrações de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de ratos após tratamento com Fe-NTA

	8-oxodGuo
	resíduos/10^6 dGuo
Controle	0,6 ± 0,07
Fe-NTA 3 h	2,5 ± 0,1*
Fe-NTA 24 h	2,2 ± 0,2*
Fe-NTA 3 h + licopeno	0,4 ± 0,1**
Fe-NTA 24 h+ licopeno	0,6± 0,15**
Fe-NTA 3) + β-caroteno	0,6 ± 0,1
Fe-NTA 24 h + β-caroteno	0,7 ± 0,08

Cada valor representa a média ± desvio-padrão (n=5 animais) para três experimentos diferentes. Animais tratados com salina+Tween 80 servem como controle. Licopeno e β-caroteno (10 mg/kg de massa corpórea) foram administrados por cinco dias consecutivos antes do tratamento com Fe-NTA (10 mg/kg massa corpórea). A comparação estatística foi realizada usando o Student's t test. Amostras são significativamente diferentes para *$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo controle e **$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo de Fe-NTA.

Tabela XVII

Concentração de licopeno e β-caroteno em próstata de ratos

	Licopeno/β-Caroteno (nmol/g tecido)
Licopeno 5 dias	0,51 ± 0,04
β-Caroteno 5 dias	0,13 ± 0,01

Os ratos *Wistar* (3 meses) receberam diariamente, injeções, *i.p,* de licopeno ou β-caroteno, 10 mg/kg de massa corpórea por cinco dias consecutivos.

Tabela XVIII

Efeito de licopeno ou β-caroteno nas concentrações de MDA em próstata de ratos após tratamento com Fe-NTA

	MDA (nmol/g tecido)
Controle	359 ± 32
licopeno 5 dias	363 ± 30
β-caroteno 5 dias	367 ± 13
Fe-NTA 3 h	817 ± 122*
Fe-NTA 24 h	1176 ± 57 *
Fe-NTA 3 h + licopeno	364 ± 17
Fe-NTA 24 h + licopeno	355 ± 35 **
Fe-NTA 3 h + β-caroteno	377± 36
Fe-NTA 24h + β-caroteno	374,4 ± 26 **

Cada valor representa a média ± desvio padrão (n=5 animais) para três experimentos diferentes. Animais tratados com salina+Tween 80 servem como controle. Licopeno ou β-caroteno (10 mg/kg de massa corpórea) foram administrados por cinco dias consecutivos antes do tratamento com Fe-NTA (10 mg/kg massa corpórea). A comparação estatística foi realizada usando o Student's t test. Amostras são significativamente diferentes para *$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo controle e **$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo de Fe-NTA.

Tabela XIX

Efeito de licopeno ou β-caroteno nas concentrações de 8-oxodGuo em DNA de próstata de ratos após tratamento com Fe-NTA

	8-oxodGuo
	resíduos/10^6 dGuo
Controle (Salina+Tween)	1,7 ± 0,3
Fe-NTA 3 h	6,3 ± 0,6*
Fe-NTA 3 h + licopeno	1,8 ± 0,3**
Fe-NTA 3 h + β-caroteno	1,9 ± 0,2

Cada valor representa a média ± desvio-padrão (n=5 animais) para três experimentos diferentes. Animais tratados com salina+Tween 80 servem como controle. Licopeno ou β-caroteno (10 mg/kg de massa corpórea) foram administrados por cinco dias consecutivos antes do tratamento com Fe-NTA (10 mg/kg massa corpórea). A comparação estatística foi realizada usando o Student's t test. Amostras são significativamente diferentes para *$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo controle e **$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo de Fe-NTA.

Tabela XX

Efeito de licopeno ou β-caroteno nas concentrações de 8-oxodGuo em DNA de linfócitos de ratos após tratamento com Fe-NTA

	8-oxodGuo
	resíduos/10^6 dGuo
Controle	1,8 ± 0,6
Fe-NTA 3 h	4,8 ± 0,6 *
Fe-NTA 3 h + licopeno	2,0 ± 0,7 **
Fe-NTA 3 h + β-caroteno	1,5 ± 0,1

Cada valor representa a média ± desvio-padrão do sangue de cinco animais. Animais tratados com salina+Tween 80 servem como controle. Licopeno ou β-caroteno (10 mg/kg de massa corpórea) foram administrados por 3 horas antes do tratamento com Fe-NTA (10 mg/kg massa corpórea). A comparação estatística foi realizada usando o Student's t test. Amostras são significativamente diferentes para *$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo controle e **$p < 0.005$, quando comparadas com o grupo de Fe-NTA.

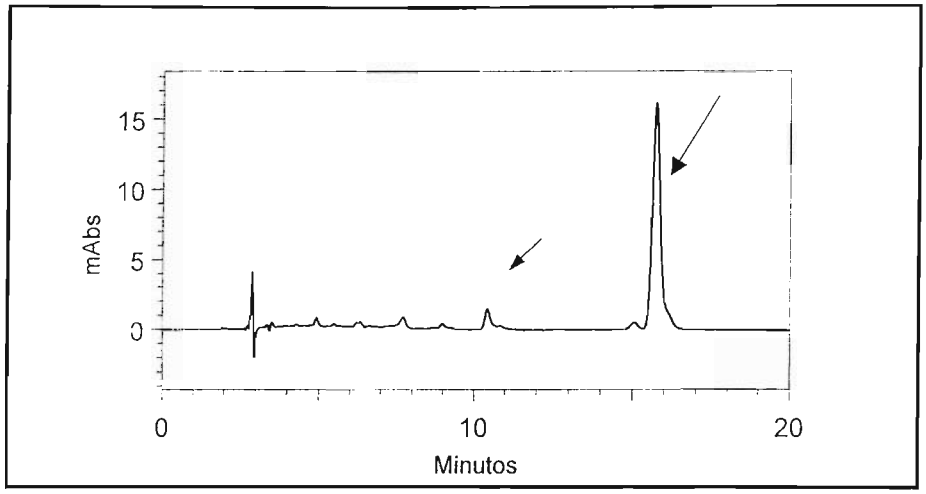

Figura 5: Cromatograma obtido por HPLC a partir do plasma sanguíneo de ratos suplementados com β-caroteno (o licopeno aparece em 10,5 min e o β-caroteno em 15,5 min). Detecção em 445 nm.

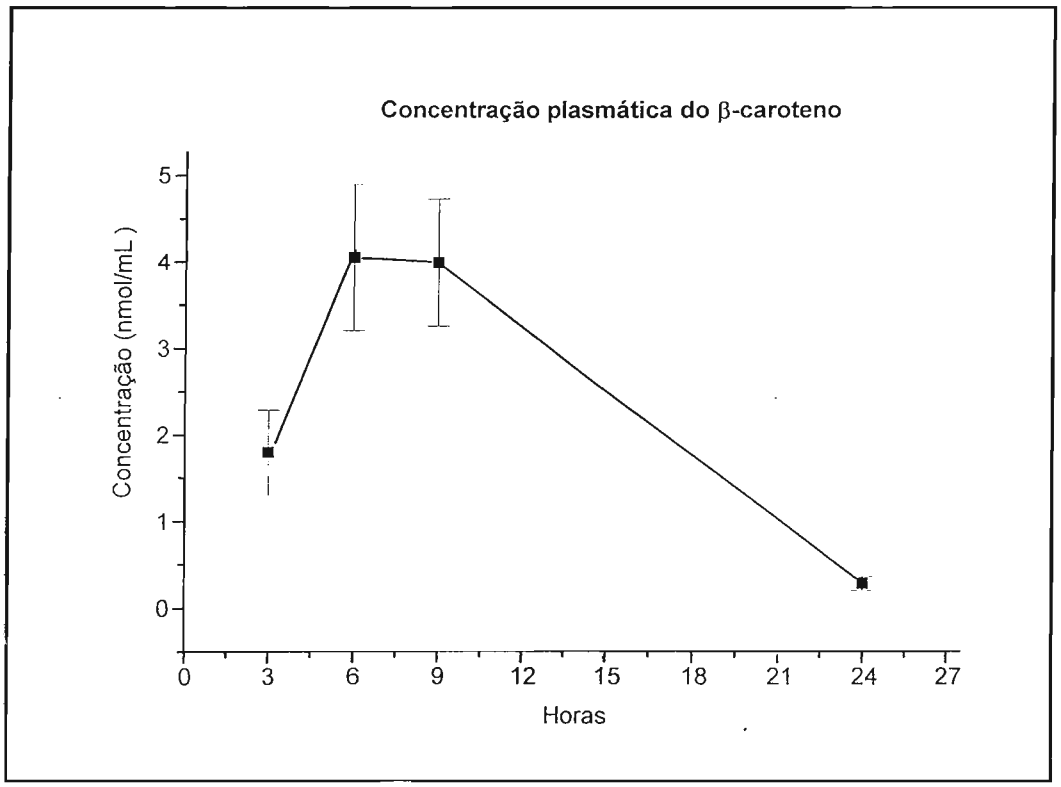

Figura 6: Curva da biodisponibilidade obtida para o β-caroteno.

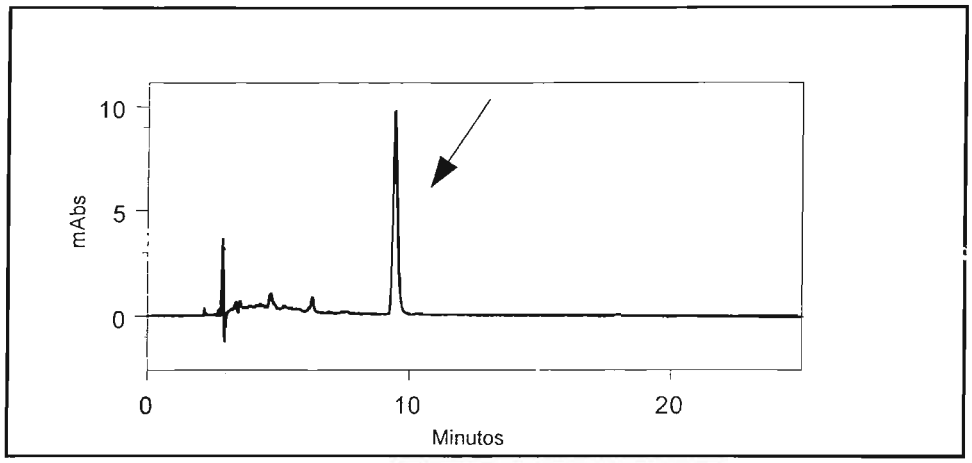

Figura 7: Cromatograma obtido do plasma de animais suplementados com licopeno (licopeno aparece em 9,7 min). Detecção em 445nm.

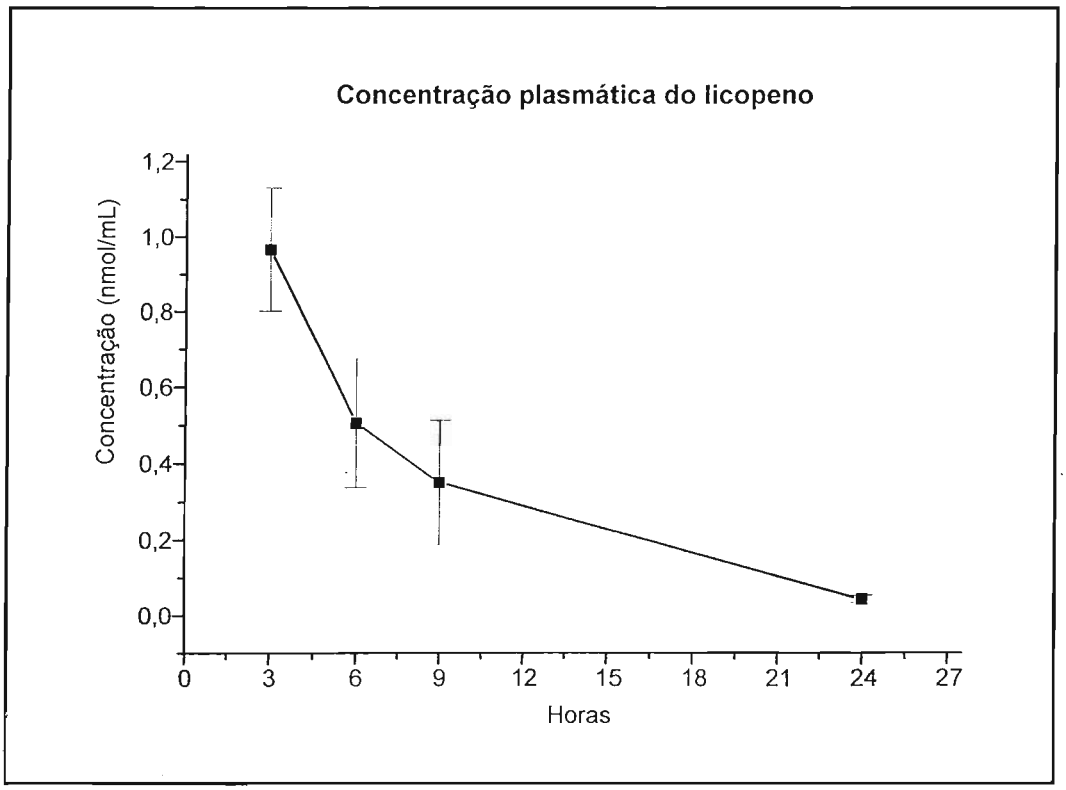

Figura 8: Curva da biodisponibilidade do licopeno.

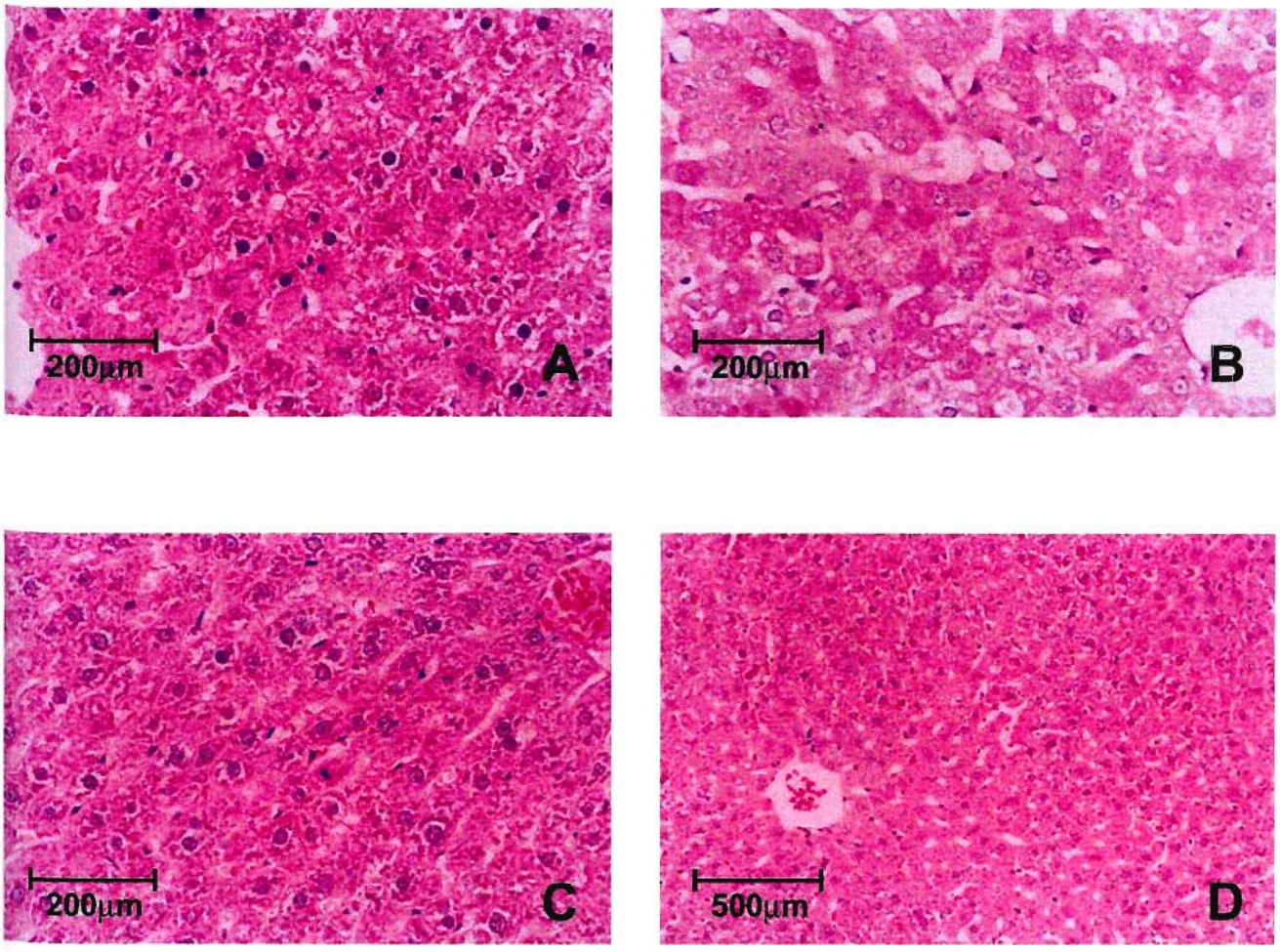

Figura 9. Painel A até D - Fotomicrografias mostrando a evolução temporal da necrose hepática induzida pelo tratamento com Fe-NTA por 3 e 24 horas. A - Necrose depois do tratamento com Fe-NTA por 3 horas. B - Necrose depois do tratamento com Fe-NTA por 24 horas. C - Redução da necrose hepática depois do pré-tratamento por 5 dias com licopeno ou β-caroteno e posterior tratamento com Fe-NTA 3 ou 24h. D - Controle do tecido hepático. (HE painel A 100X; painel - B 100X; painel C 100X; painel D 40X). Fe-NTA 10 mg/kg de massa corpórea.

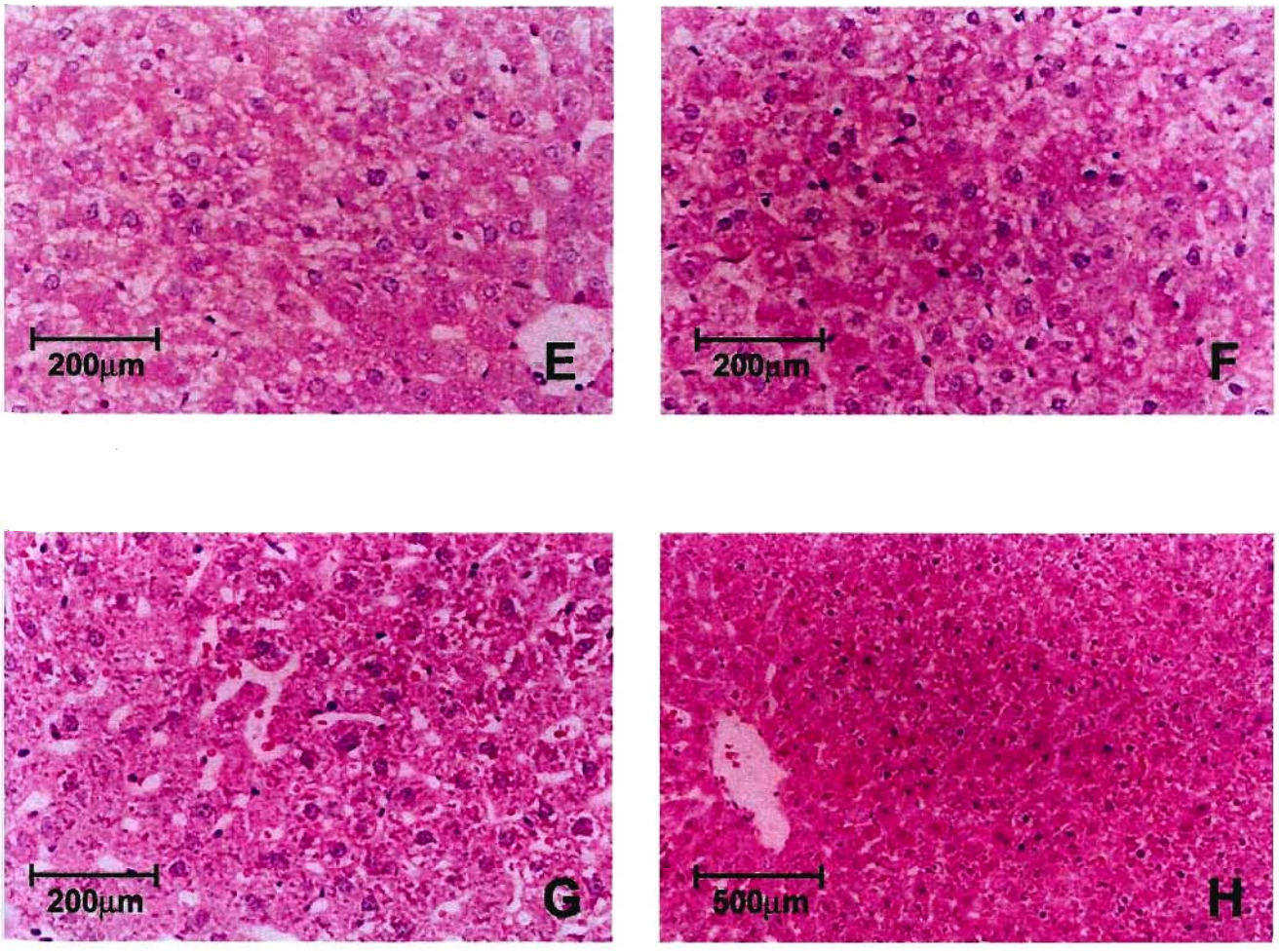

Figura 10. Painel E até H - Fotomicrografias do tecido hepático mostrando a evolução temporal da degeneração lipídica. E - visão panorâmica dos hepatócitos mostrando a degeneração lipídica depois do tratamento com Fe-NTA por 3 horas. F - Hepatócitos mostram uma intensa degeneração lipídica depois do tratamento com Fe-NTA por 24 horas. G - Hepatócitos pré-tratados por 5 cinco dias com licopeno ou β-caroteno e tratados posteriormente com Fe-NTA 3 ou 24h mostram uma uniforme coloração do citoplasma devido a redução da degeneração lipídica. H - Controle do tecido hepático. (HE Painel E 100X; painel F 100X; painel G 100X; painel H 40X). Fe-NTA 10 mg/kg de massa corpórea.

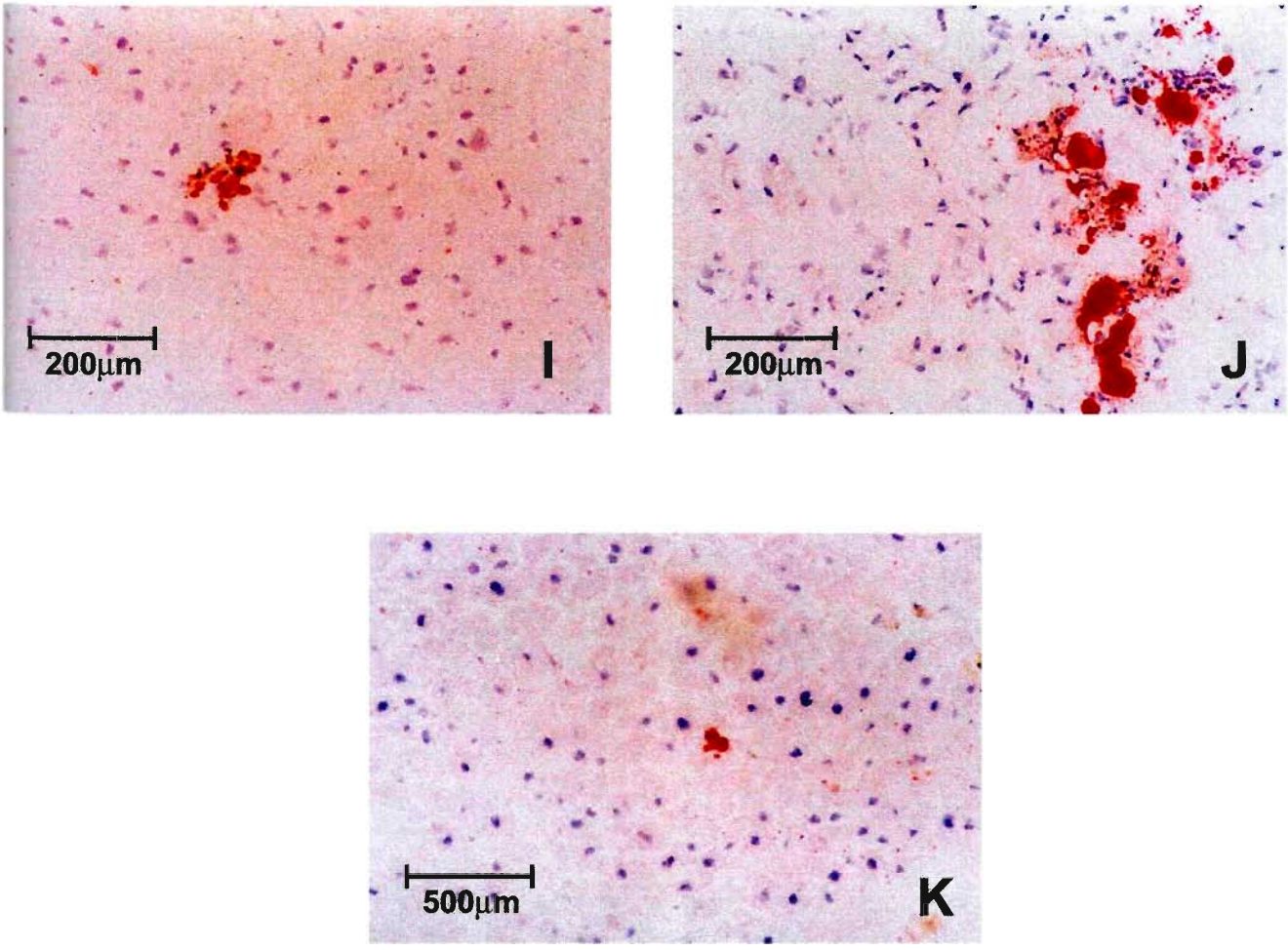

Figura 11. Painel I até K - Fotomicrografias mostrando a evolução temporal da degeneração lipídica visualizada por coloração com Sudam IV. I - Pequeno aumento de gordura no hepatócito depois do tratamento com Fe-NTA por 3 horas. J - Intensa deposição de gordura no hepatócito depois do tratamento com Fe-NTA por 24 horas. K - Redução da deposição de gordura no hepatócito com o pré-tratamento com licopeno ou β-caroteno por 5 dias e posterior tratamento com Fe-NTA 3 ou 24. (Sudam IV - Painel I 100X; painel J 100X; painel K 40X). Fe-NTA 10 mg/kg de massa corpórea.

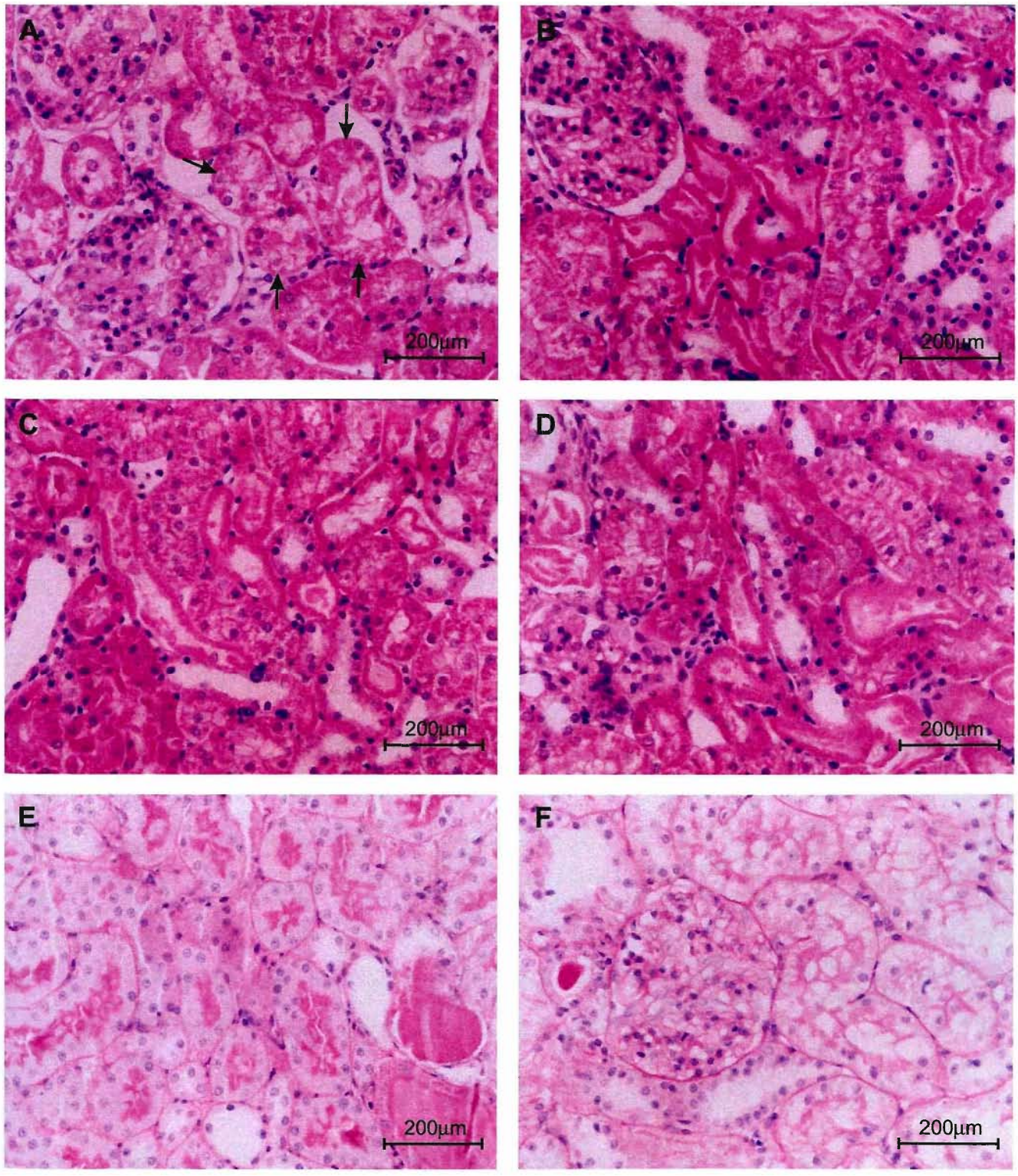

Figura 12. Painel A até F - Fotomicrografias mostrando a extensão da severidade e agressão celular induzida pelo tratamento com Fe-NTA por 3 e 24 h em cortes histológicos seriados de rim. A - Degeneração hidrópica (setas) nos túbulos proximais (escore 4). B - Glomérulo normal ao lado de túbulos proximais com necrose e degeneração hidrópica. C e D - Necrose hialina difusa dos túbulos proximais. E e F - Acúmulo de mucopolissacarídeo (PAS) neutros nos túbulos proximais decorrente da agressão celular induzida por Fe-NTA. (Painel A D: HE 200X. Painel E - F : PAS 200X).

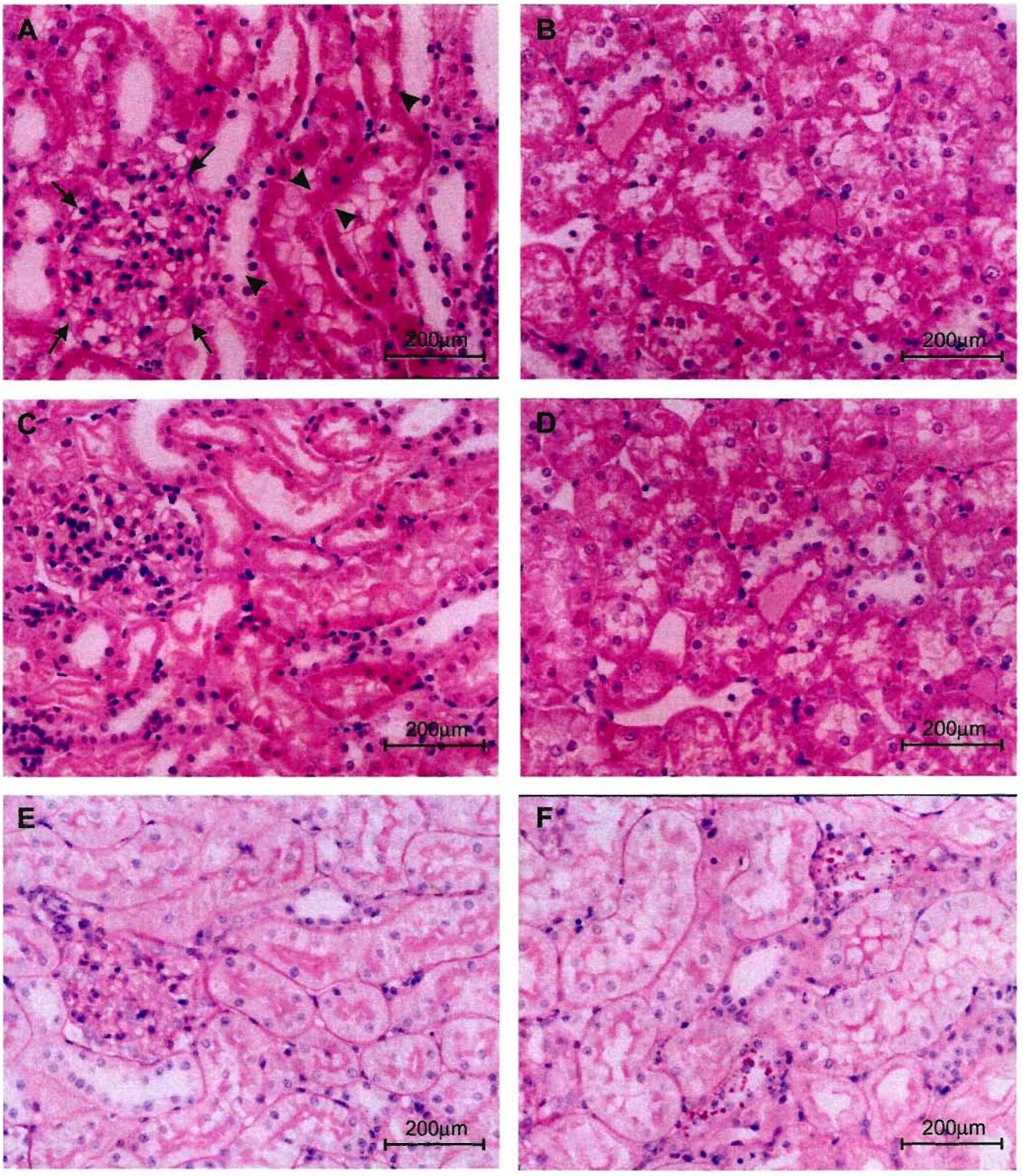

Figura 13. Painel A até F - Fotomicrografias mostrando o efeito do pré-tratamento com carotenóides (licopeno ou β -caroteno) durante 5 dias e posterior tratamento com Fe-NTA por 3 e 24 horas em cortes histológicos seriados de rim. Os cortes histológicos mostram uma menor extensão da severidade e agressão celular (escore 2). A - Degeneração hidrópica (setas) nos túbulos proximais (escore 4). B - Glomérulo normal intacto ao lado de túbulos proximais com necrose hialina e degeneração hidrópica. C e D -Túbulos proximais ainda com necrose hialina difusa. E e F - Restauração da histoarquitetura tubular pode ser melhor visualizada com o acúmulo de mucopolissacarídeo neutros (PAS) nos túbulos proximais (Painel A D: HE 200X). Painel E - F : PAS 200X).

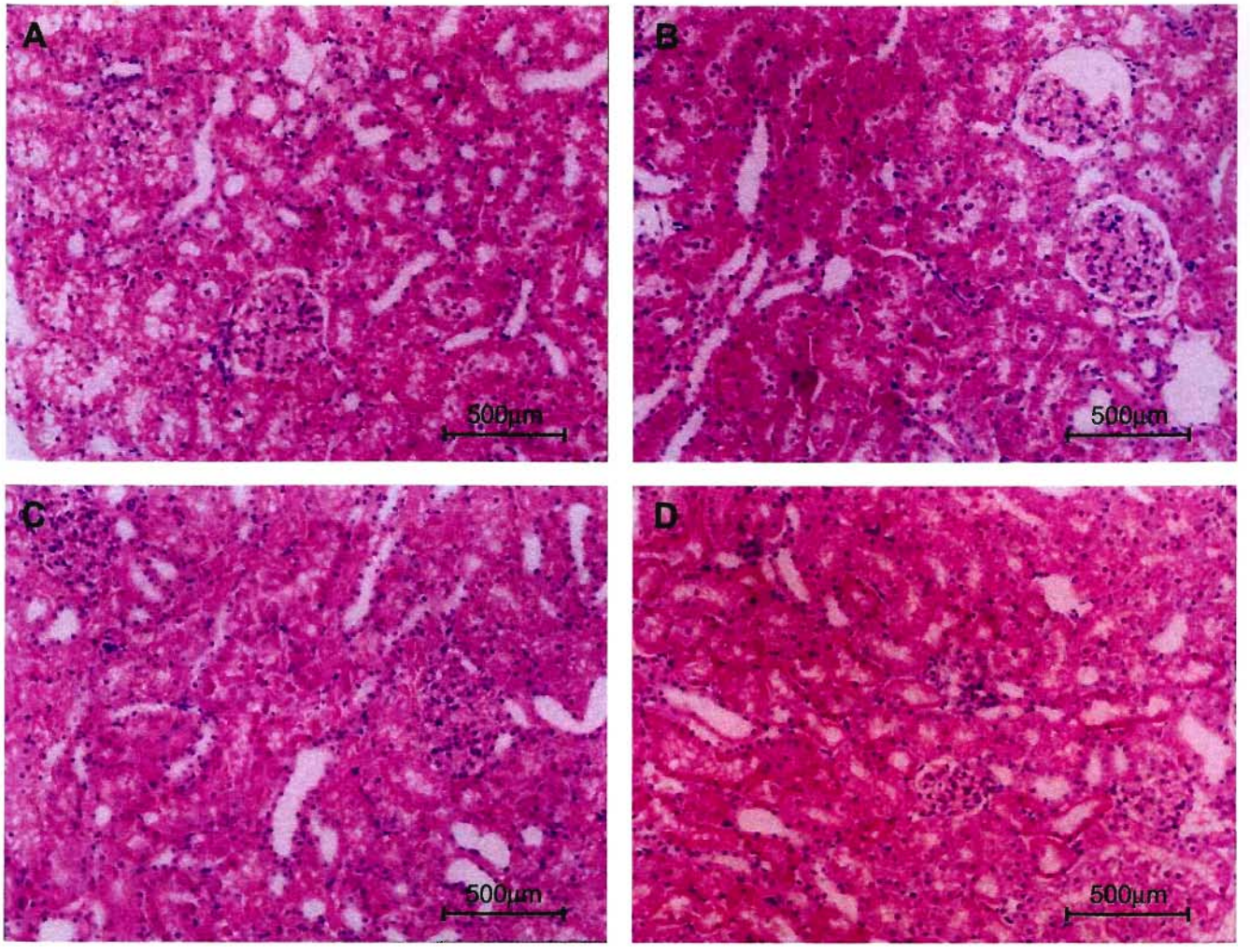

Figura 14. Painel A até D - Fotomicrografias mostrando panorâmicas das células renais após o pré-tratamento com carotenóides (licopeno ou β-caroteno) durante 5 dias e posterior tratamento com Fe-NTA por 3 e 24 horas. Painéis de A até D - mostram a preservação da histoarquitetura renal. (Painel de A D : HE 40X).

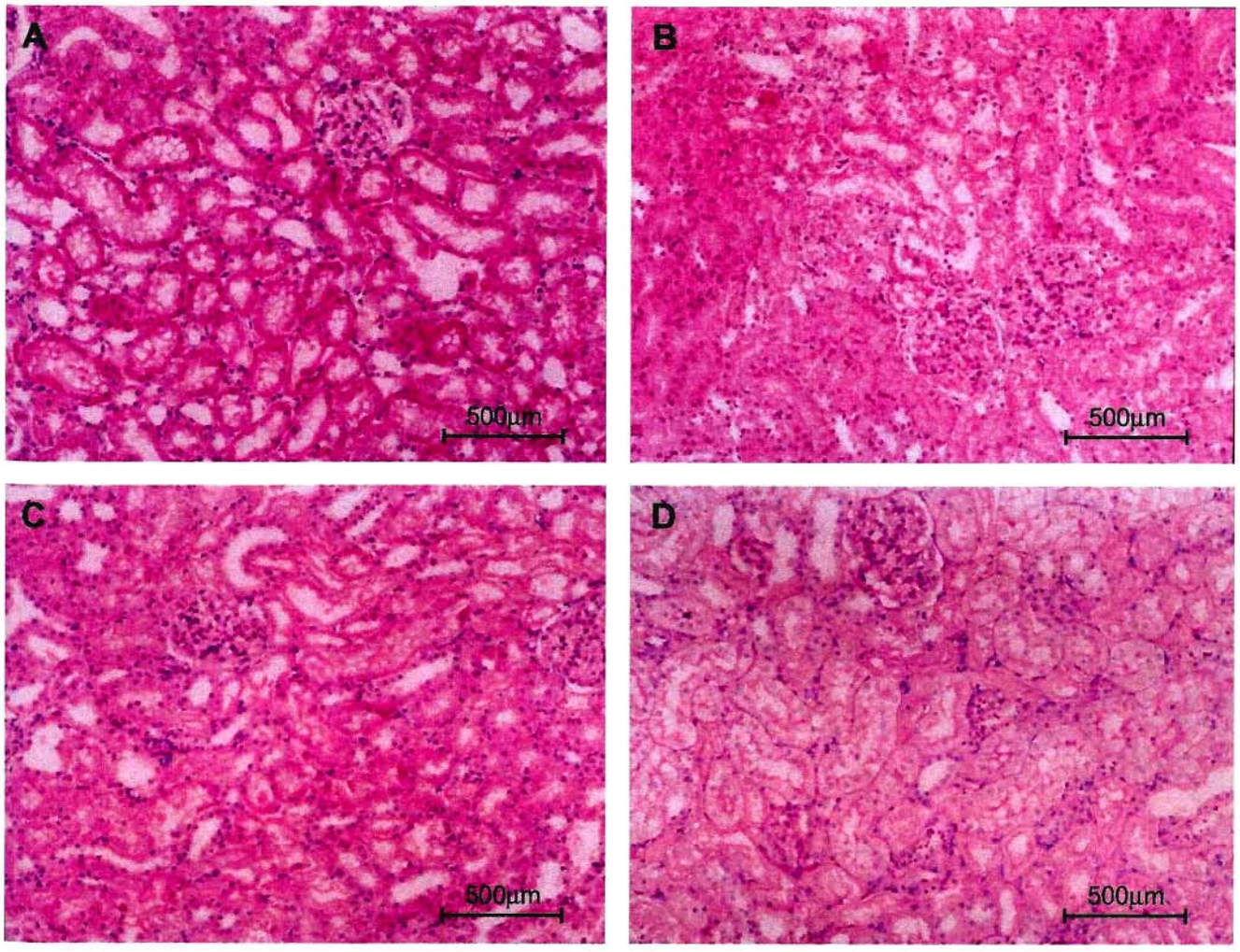

Figura 15. Painel de A até D - Fotomicrografias mostrando panorâmicas da agressão renal induzida pelo tratamento com Fe-NTA por 3 e 24 h. Notar o aumento das características tintoriais citoplasmáticas decorrente da necrose e a vacuolização difusa decorrente da degeneração hidrópica. Painéis A até C : HE 40X; Painel D : PAS 40X

5 - DISCUSSÃO

Apesar do oxigênio molecular ser essencial para a obtenção de energia pelos organismos aeróbicos, esta molécula também está associada a geração de espécies reativas potencialmente tóxicas para os organismos vivos. A reatividade dessas espécies varia muito mas algumas são reativas o suficiente para provocar lesões em biomoléculas como o DNA, lipídeos e proteínas. Entre as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio temos o íon radical superóxido, o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxila, os compostos carbonílicos tripletes, o oxigênio eletronicamente excitado ao estado singlete, o óxido nítrico, o peróxinitrito, entre outras. A formação dessas espécies pode preencher funções biológicas importantes como no caso do combate a microorganismos invasores e controle da pressão sanguínea. É importante ressaltar que algumas das interações entre essas espécies reativas estão sendo reconhecidas como parte de segmentos de cascatas de transdução de sinal. Por outro lado, devido a sua reatividade, tais espécies podem também acarretar danos em biomoléculas e estruturas celulares, fenômenos associados a eventos patológicos que podem estar envolvidos nos mecanismos de diversas doenças (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Entre as lesões em biomoléculas, já encontra-se bem descrito que o estresse oxidativo pode causar danos no DNA, como fragmentação e apoptose, modificações em bases (tal como dímeros de timina, alquilação de bases ou formação de 8-oxodGuo) (Dreher 1996; Singer e Bartsch, 1999) e quebras em DNA (Sarker e col., 1995). Modificações oxidativas em DNA têm sido implicadas em mutagênese e carcinogênese (Halliwel

ecol., 1999; Okada ecol., 1995; Dreher e col., 1996; Sarker e col., 1995; Di Mascio e col., 1990; Ribeiro e col., 1992).

O ferro é ubíquo na vida dos organismos e desempenha um papel essencial como elemento que existe em baixa concentração. Por outro lado, o ferro pode produzir injúrias oxidativas em algumas condições, tal como inflamação, transplante de órgãos, carcinogênese e envelhecimento (Halliwel e col., 1999). Nitrilotriacetato de ferro é um bom modelo de sistema gerador de estresse oxidativo e indutor de carcinogênese (Okada e col., 1995).

Com o intuito de investigar os possíveis mecanismos associados ao efeito antioxidante de carotenóides este estudo investigou a indução de lesões oxidativas em biomoléculas (lipoperoxidação e oxidação de dGuo) promovida por tratamento com Fe-NTA em células em cultura e *in vivo*. Lesões histopatológicas associadas a esse proceso também foram analisadas. Ressaltamos que a sobrecarga de ferro é um dos modelos de estresse oxidativo adotado pelo grupo responsável pelo projeto "Biomarkers of Oxidative Stress" (BOSS), projeto desenvolvido por cerca de dez laboratórios norte-americanos sob a coordenação da Dra. M. B. Kadiiska, National Institute of Environmental Science (NIEHS), com o objetivo de determinar biomarcadores sensíveis de estresse oxidativo em roedores e humanos (http://dir.niehs.nih.gov/dirover/biomarkers.htm).

Para facilitar a discussão dos resultados, este tópico será dividido em duas partes:

1 - Efeito protetor de licopeno contra lipoperoxidação e lesão em DNA em células em cultura

Apesar dos efeitos antioxidantes do licopeno estarem bem estabelecidos em sistemas *in vitro* (Di Mascio e col. 1989), e em alguns estudos *in vivo* (Stahl e Sies, 1996 e Giovannucci, 1999), poucos estudos existem sobre seus efeitos em células em cultura. Como se trata de um sistema de controle mais simples quando comparado com estudos *in vivo*, iniciamos nossos estudos com suplementação de células de mamífero (CV1-P) com licopeno e posterior exposição ao sistema Fe-NTA/ascorbato.

Nossos resultados mostram que a suplementação de células, CV1-P com licopeno (20 pmol/10^6 células) e posterior tratamento com Fe-NTA/ascorbato reduziram os níveis de lipoperoxidação acompanhado pelo decréscimo de compostos tiólicos não protéicos (NP-SH) **(Tabela IV).** Esses resultados estão de acordo com dados publicados anteriormente (Hartwig e col., 1993) mostrando aumento de TBARS após 1 h de incubação de células de mamífero com Fe-NTA.

Além do processo de peroxidação lipídica, um possível dano oxidativo em DNA das células (8-oxodGuo) também foi investigado. Nossos resultados mostraram que a concentração de 8-oxodGuo aumentou mais de oito vezes no DNA das células tratadas com Fe-NTA quando comparadas com o controle. O pré-tratamento das células com licopeno diminuiu em 77% a concentração de 8-oxodGuo indicando que o licopeno promove forte proteção contra oxidação de bases de DNA. Os

possíveis mecanismos associados a essa proteção serão discutidos a seguir junto com os resultados obtidos com os estudos *in vivo*.

1 - Efeito protetor de licopeno e β-caroteno contra lesões em biomoléculas e alterações histológicas em tecidos de ratos expostos a Fe-NTA

Diversos estudos epidemiológicos e experimentais têm sugerido uma associação entre saúde e dietas ricas em frutas e vegetais (Sarker 1995). Entre os componentes dessas dietas, evidências experimentais baseadas principalmente em estudos *in vitro*, apontam que carotenóides podem estar exercendo um importante papel nos mecanismos de proteção e diminuição de risco de câncer associado a esse tipo de alimentação (Giovanucci, 1999 e Stahl e Sies, 1996).

Visando contribuir para o esclarecimento dos possíveis mecanismos envolvidos na proteção verificada nos estudos com dietas, utilizamos o modelo de indução de estresse oxidativo através de tratamento de ratos com injeção *i.p* com Fe-NTA por 3 e 24 horas. Após os tratamentos, o fígado, rim, pulmão, próstata e linfócitos foram analisados para avaliar parâmetros associados ao estresse oxidativo (lipoperoxidação e 8-oxodGuo). Alguns dos tecidos foram também avaliados com relação a possíveis alterações histológicas associadas ao tratamento.

Em todos os tecidos analisados, o tratamento com Fe-NTA induziu o estresse oxidativo, como resumido à seguir:

2.1- Efeito do tratamento com Fe-NTA em ratos

Fígado: Após tratamento com Fe-NTA, observamos no DNA de hepatócitos (**Tabela VIII**) concentrações de 8-oxodGuo 4 a 5 vezes maior que as concentrações encontradas no DNA do grupo controle. Com relação aos dados obtidos nos estudos histológicos observamos que o tratamento com Fe-NTA induziu modificações pré-carcinogênicas. Na **Figura 9** mostramos a evolução da morte celular (necrose) no fígado dos animais tratados onde observamos um aumento no escore de 1 para o tratamento com Fe-NTA por 3h e escore de 4 para o tratamento com Fe-NTA por 24 h (**Tabela IX**). É importante ressaltar que esteatose e necrose são morfologicamente tipos distintos de injúrias que podem ser induzidos por danos oxidativos (Fargion e col, 2000). Os dados também permitiram acompanhar a evolução temporal da degeneração lipídica induzida por Fe-NTA (**Figura 10 e 11).**

As lesões observadas são especialmente interessantes para a proposição de mecanismos de lesão uma vez que foram acompanhadas pelo aumento de ferro no hepatócito **(Tabela IX)** e um significante aumento no nível de MDA (58% -75%) conhecido indicador de estresse oxidativo associado a lipoperoxidação **(Tabela VII).** A indução de um estado pró-oxidante foi também observado por Kuchino (1987) que relatou diminuição nas concentrações de glutationa hepática após a administração de Fe-NTA.

Rim: A habilidade de Fe-NTA em promover danos em DNA e membranas celulares tem sido apontada como um mecanismo crítico de carcinogênese renal associada com injeção intraperitonial deste complexo.

De fato, Toyokuni e col. (1994) reportaram diversas modificações oxidativas em bases na cromatina renal de ratos submetidos ao tratamento por 24 h com Fe-NTA. Estas lesões são tipicamente produtos de reação com o radical hidroxila (HO·).

Os nossos resultados mostram um aumento na concentração de 8-oxodGuo em DNA de rim de 8 a 9 vezes depois do tratamento dos ratos com Fe-NTA por 3 horas e por 24 horas em relação à concentração observada no DNA do grupo controle **(Tabela XII).**

Com relação a lipoperoxidação, o tratamento induziu aumento na concentração de MDA de 84 a 221% depois do tratamento com Fe-NTA por 3 e 24 h quando comparado com à concentração no rim de animais do grupo controle **(Tabela XI).**

A presença de injúria renal foi também revelada por estudos histológicosmostra que mostraram a evolução de uma leve degeneração em balão nos túbulos proximais, culminando com uma severa necrose hialina no epitélio de um túbulo proximal depois do tratamento com Fe-NTA (**Figuras 12 e 15**).

Próstata: Diversos estudos têm apontado uma possível contribuição de espécies reativas de oxigênio nos mecanismos associados ao câncer de próstata. As células epiteliais da próstata de muitos homens na idade de risco de câncer estão sujeitas a exposição às espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio relacionadas com inflamações por causa da alta incidência de prostatites. (Ripple e col., 1997; Malins e col., 1997). Neste sentido, avaliar danos oxidativos nesse tecido é especialmente importante.

De fato, nossos resultados em próstatas de ratos tratados com injeção *i.p* de Fe-NTA mostraram um aumento significativo ($p<0,005$) na concentração de MDA (128% a 226%) quando comparamos à concentrações do controle (**Tabela XVIII**). O mesmo efeito ocorreu para a concentração de 8-oxodGuo que aumentou cerca de 4 vezes após o tratamento com Fe-NTA por 3 horas (**Tabela XIX**).

Pulmão: As fontes de espécies reativas diferem com o tipo de tecido e inclui fumo, irradiação solar, inflamação crônica e processos metabólicos normais (Cerutti 1985; Wiseman e Halliwell 1996; Ames e col., 1993). Por exemplo, os pulmões de fumantes estão expostos a altas concentrações de radicais livres. Por exemplo, o óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) presente na fumaça de cigarro pode reagir com o oxigênio para produzir $^{\bullet}NO_2$. Os radicais $^{\bullet}NO_2$ sobrevivem tempo bastante na fumaça para alcançar o tecido pulmonar. A fumaça de cigarro também age como irritante ativando macrófagos que irão gerar mais espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (Halliwell e Gutteridge 1999). Sendo o pulmão alvo dessas espécies o estudo do efeito de antioxidantes nesse tecido também merece atenção especial.

O tratamento com Fe-NTA causou substancial lipoperoxidação em pulmões de ratos quando monitorado pela formação de MDA. Obtivemos aumentos de 59% a 239% nas concentrações de MDA após o tratamento quando relacionados às concentrações obtidas no pulmão do grupo controle (**Tabela XV**). As concentrações de 8-oxodGuo no DNA de pulmão de ratos submetidos ao tratamento com Fe-NTA aumentaram cerca 4 vezes em relação ao DNA de pulmão de animais controle (**Tabela XVI**).

Linfócitos: Nossos estudos também investigaram lesões oxidativas em DNA de linfócitos. Os dados obtidos (**Tabela XX**) com o tratamento de ratos com Fe-NTA por 3 horas mostraram também um aumento significativo (4,8 vezes) na concentração de 8-oxodGuo em DNA de linfócitos quando comparadas às concentrações em DNA dos ratos do grupo controle.

Em resumo, o tratamento de ratos com Fe-NTA induziu danos oxidativos em biomoléculas em todos os tecidos estudados e importantes alterações histológicas nos tecidos analisados.

O ferro está envolvido em muitas reações biológicas e é essencial para muitas formas de vida. Apesar disso, distúrbios na homeostase de ferro podem ter conseqüências dramáticas para as células (Meneghini e col. 1995). O envolvimento do ferro em diversas patologias ocorre através de uma variedade de mecanismos, incluindo desde processo de deposição, ativação ou inativação de sistemas enzimáticos, diminuição das funções de fagócitos e interferência em apoptose (Simonart e col. 2000).

A indução de estresse oxidativo promovida por Fe-NTA não foi apenas demonstrada através da indução de lesões em biomoléculas como também já foi detectada a formação de radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) em plasma sanguíneo de ratos 1 hora após a administração de Fe-NTA (Matsura e col., 1983). Tal fato sugere que o complexo de ferro leva à produção desse radical. Para isso é necessário que o ferro do complexo seja inicialmente reduzido por agentes redutores presentes no sangue, tais como ascorbato ou glutationa (Preece e col., 1988). As reações podem ser assim esquematizadas (Preece e col., 1988):

$NTAFe^{3+} + e^{-} \rightarrow NTAFe^{2+}$

$NTAFe^{2+} + O_2 \leftrightarrow [NTAFe^{2+}O_2] \leftrightarrow [NTAFe^{3+}O_2^{-}] \leftrightarrow NTAFe^{3+} + O_2^{\bullet -}$

O radical superóxido formado promove a redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} e produção de H_2O_2 para a subseqüente reação de Fenton (Preece e col., 1988):

$O_2^{\bullet -} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$

$2\ O_2^{\bullet -} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2$

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{-} + HO^{\bullet}$ (reação de Fenton)

Dessa forma, o processo de peroxidação lipídica pode ser iniciado pela abstração, por radicais $HO^{\bullet}$, de átomos de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (Preece e col., 1988). Os radicais iniciais gerados nesse processo, assim como espécies reativas secundárias formadas a partir de reações do radical inicial podem induzir os danos moleculares observados.

2.2- Efeito protetor de carotenóides em tecidos de ratos tratados com Fe-NTA

Licopeno é um carotenóide presente em sangue humano em níveis que variam de 0,22 - 1,06 nmol/mL (Stahl e col., 1996). Já foi suficientemente esclarecido que as dietas mediterrâneas ricas em carotenóide são saudáveis. Uma correlação direta entre níveis de licopeno e a saúde já foi descrita em muitos estudos, em que níveis significativamente altos de licopeno e selênio diminuíram a incidência de

câncer de bexiga e de pâncreas quando comparados com o controle (Helzlsouer 1989; Burney 1989). Um importante estudo epidemiológico também relatou um baixo risco de câncer de próstata em dietas ricas em licopeno (Giovannucci 1999). Desde de 1981 vários experimentos têm sido realizados para mostrar que o beta-caroteno pode funcionar como agente redutor da incidência de câncer em humanos (Peto e col., 1981). Krinsky (1991), mostrou que o β-caroteno inibiu mutagenicidade, transformação malígna em célula e formação de tumor, sugerindo, portanto, com este estudo que o β-caroteno estaria exercendo um importante papel em modular as ações relacionadas a processos carcinogênicos. Quando suplementamos ratos com licopeno ou β-caroteno por 5 dias e submetemos os mesmos ao tratamento com Fe-NTA, verificamos que as concentrações de MDA e 8-oxodGuo em fígado, rim, pulmão, próstata diminuem ao nível encontrado no DNA do controle (**Tabelas VII e VIII, XI e XIII, XV e XVI, XVII e XIX**). A concentração de 8-oxodGuo também foi reduzida em linfócitos de ratos suplementados com os carotenóides **(Tabela XX).** Os resultados com linfócitos são particulamente interessantes uma vez que estudos com humanos vêm tentando associar níveis de carotenóides em plasma e marcadores de estresse oxidativos em linfócitos.

Verificamos também que os danos pré-carcinogênicos, necrose e degeneração lípidica foram também expressivamente reduzidos em fígado e rim (**Figuras 9-11** e **13-14**, **Tabela IX e XIII).** A proteção observada é também nítida para parâmetros como o acúmulo de lipídios (diminuição de 4 a 5 vezes) e redução do acúmulo de ferro no hepatócito. A análise da

Tabela VI indica que o licopeno no fígado exerceu sua ação antioxidante sem ser consumido pelas espécies reativas de oxigênio, provavelmente por um mecanismo de supressão física, o mesmo não acontecendo com o β-caroteno que teve sua concentração diminuída em mais de 7 vezes, pois pode ter sofrido oxidação pelas espécies reativas de oxigênio (Stahl e col., 1996). Além disso, o β-caroteno sofre o efeito de primeira passagem no fígado, sendo convertido para vitamina A, já diminuindo desta maneira sua concentração.

De fato, a atividade antioxidante de carotenóides *in vitro* está bem estabelecida pela descrição de sua propriedade de supressão do $^1O_2$ (Foote e col., 1968) e sua habilidade para seqüestrar radicais peroxilas (Burtun e col., 1984). A supressão do oxigênio singlete por carotenóides ocorre por supressão química e física, vias que têm sido discutidas em detalhe na literatura (Krinsk e col., 1989; Sies e col., 1995). A eficiência da supressão física excede muito a química e envolve transferência de energia do $^1O_2$ para o carotenóide, resultando em oxigênio no estado fundamental e carotenóide excitado no estado triplete. A energia deste estado é dissipada em forma de calor através de interações rotacionais e vibracionais, produzindo carotenóide na forma fundamental (Tachon e col., 1989; Di Mascio e col., 1996; Di Mascio e col., 1989; Krinsky, 1991).

$$^1O_2 + \beta\text{-caroteno} \rightarrow {}^3O_2 + {}^*\beta\text{-caroteno}$$

$$^*\beta\text{-caroteno} \rightarrow \beta\text{-caroteno} + \text{energia (calor)}$$

Alguns estudos relatam a influência da diminuição de carotenóides na dieta e o estado da defesa antioxidante. A diminuição de carotenóides tem sido associada com o aumento no plasma de substâncias reativas ao

ácido tiobarbitúrico, um índice de estresse oxidativo (Dixon e col., 1994; Mobarhan e col., 1990).

Zhao e col. (1998) demonstram que quando ratos, machos e fêmeas, são alimentados com uma dieta contendo uma mistura de carotenóides extraídos do tomate, por dez semanas, observa-se um grande aumento da concentração de licopeno em fígado (120-42 μg/g). Níveis fisiologicamente significativos de licopeno foram também encontrados em próstata (97-47 ng/g), pulmão (227-134 ng/g), glândulas mamárias (309 -174 ng/g) e plasma (285 -160 ng/mL). Desta forma, a suplementação dos animais está diretamente ligada a manutenção do estado antioxidante não enzimático com a conseqüente diminuição da extensão da lipoperoxidação induzida por Fe-NTA. O licopeno é um dos principais carotenóides encontrados no tecido pulmonar e as concentrações variam amplamente entre os indivíduos (Schmitz e col., 1991). Usando um ensaio *in vitro,* Böhm e col. (Bohm e col., 1995) mostraram que os carotenóides são eficientes em proteger linfócitos contra danos provocado pelo radical $^{\bullet}NO_2$. Nesse estudo, os autores mostraram que o licopeno foi pelo menos duas vezes mais efetivo que o β-caroteno nessa proteção. O licopeno possui também propriedades anticancerígenas como demonstrado em um modelo de carcionogênese de pulmão em ratos (Kim e col., 1997). As propriedades farmacocinéticas do licopeno e β-caroteno permanecem pobremente compreendidas e é prematuro recomendar o uso de doses farmacológicas de licopeno para qualquer benefício à saúde. São claramente necessários mais estudos sobre biodisponibilidade, farmacologia e biologia destes carotenóides

potencialmente importantes. Até que dados mais definitivos considerando benefícios específicos de formas purificadas do licopeno e β-caroteno estejam disponíveis, as recomendações atuais devem enfatizar os benefícios à saúde de dietas ricas em uma variedade de frutas e vegetais, incluindo tomates, cenouras e seus produtos derivados.

Os nossos dados mostraram também um aumento nas concentrações de licopeno e β-caroteno no fígado, rim, pulmão e próstata (**Tabelas VI, X, XIV e XVII**) depois da suplementação por cinco dias com estes carotenóides. Também observamos que as concentrações de licopeno e β-caroteno no plasma de ratos aumentam depois de injeção *i.p.* de 10 mg/Kg dos carotenóides (**Figuras 6 e 8**).

Portanto, utilizando o modelo de indução de estresse oxidativo através de injeção *i.p.* de Fe-NTA em ratos suplementados ou não com licopeno e o β-caroteno nossos resultados mostraram que esses carotenóides conseguiram previnir os danos oxidativos em todos os tecidos estudados. A inibição destes processos oxidativos pelos carotenóides, deve estar associada as suas habilidades, já amplamente demonstradas em sistemas *in vivo*, em seqüestrar radicais peroxila e (Stahl e col., 1996) oxigênio singlete (Di Mascio e col., 1989).

Os resultados aqui descritos podem portanto contribuir para o melhor conhecimento dos mecanismos por meio dos quais os carotenóides podem vir a contribuir para uma boa saúde. É importante ressaltar que os dados obtidos em células e *in vivo* reforçam a possível ação antioxidante dessas espécies mas não descartam a participação de outros efeitos que vem sendo atribuídos a carotenóides, como por exemplo, o aumento da

comunicação intracelular da junção "gap", redução de imunosupressão e atividade pró-vitamina A (no caso do beta-caroteno) (Rao e Agarwal, 1999).

6 - CONCLUSÕES

Existe um interesse crescente sobre o papel da nutrição na prevenção de diversas doenças associadas a processos oxidativos. Estudos epidemiológicos sugerem a participação de carotenóides na redução de risco de câncer, doenças cardiovasculares, catarata, entre outras. Apesar dos diversos trabalhos com seres humanos, os mecanismos dessa possível proteção ainda não estão comprovados, uma vez que existem ainda poucos estudos com sistemas modelo *in vivo*. Os resultados aqui apresentados, realizados em células e em ratos tratados com o conhecido sistema gerador de lesões oxidativas *in vivo* (FeNTA), demonstram que: (i) pré-tratamento de células de mamífero com licopeno leva à proteção contra lesões oxidativas (lipoperoxidação e 8-oxodGuo) induzidas por tratamento com ferro; (ii) em ratos tratados com FeNTA *i.p.*, tanto o licopeno como o beta-caroteno protegeram contra lesões oxidativas em biomoléculas (membranas e DNA) em diversos sítios (rim, fígado, próstata, pulmão e linfócitos); (iii) licopeno e beta-caroteno reduziram de maneira expressiva as alterações histológicas, típicas de lesões pré-carcinogênicas (necrose, esteatose, degeneração em balão) nos tecidos estudados.

Estes dados sugerem que o licopeno e o beta-caroteno têm ação antioxidante na proteção de lesões oxidativas induzidas por ferro e contribuem para o esclarecimento da ação biológica dos carotenóides em organismos submetidos a sistemas que induzem o estresse oxidativo. A conhecida habilidade desses carotenóides em seqüestrar radicais peroxila

oxidativas em biomoléculas e alterações histológicas nos tecidos, aqui descritas.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S. P., KAVKA, K. S., WYKES, E. J., HOLDER, S. B., GALLUPI, G. R. Hindered Dialkylation Nucleoside Phosphite Reagents in the synthesis of 2 DNA 51-Mers. *J Am Chem Soc.* **105**, 661-663, 1983.

AGARWAL, K. L., CASHION, P. J., YAMAZAKI, A., KHORANA, H. G. Chemical Synthesis of Polynucleotides. *Angewandte Chemie-international Edition* **11**, 451-&, 1972.

AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* **221**: 1256-1264, 1983.

AMES B. N., SHIGENAGA M. K., HAGEN T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:7915-22, 1993.

ANDERSON, R.L., BISHOP, W.E., CAMPBELL, R.L.A review of the environmental and mammalian toxicology of nitrilotriacetic acid. *Crit. Rev. Toxicol.* **15:** 1-102, 1985.

APGAR J, MAKDANI D, SOWELL AL, Serum carotenoid concetrations and their reproducibility in children in Belize. *Am J Clin Nutr.* **64**: 726-30, 1996.

AWAI, M., NARASAKI, M., SENO, S. The induction of diabetic changes in rats by intraperitoneal injection of Fe^{3+}-NTA.In *Proteins of iron metabolism* (E.B. Brown, P.Aisen, J. Fielding, and R.R.Crichton, eds.), 411-416, Grune & Stratton, New York, 1977.

AWAI, M., NARASAKI, M., YAMANOI, Y., SENO, S. Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *Amer J Pathol.* **95**: p.663-674, 1979.

BABIOR BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med.,* **289**: 659-668; 721-725, 1978.

BACON, B.R., TAVILL, A.S., BRITTENHAM, G.M., PARK, C.H., RECKNAGEL, R.O. Hepatic lipid peroxidation *in vivo* in rats with chronic iron overload. *J Clin Invest* **71**: 429-439, 1983.

BARTSCH, H., SINGER, B. Exocyclic DNA Aducts in Mutagenesis and

Carcinogenesis. Editors: B. Singer & H. Bartsch (IARC Scientific publications; 150).

BERTRAM, J.S.; PUNG, A.; CHURLEY, M.; KAPPOCK, T. D.; WILKINS, L. Diverse carotenoids protect against chemically-induced neoplastic transformastion. *Carcinogenesis,* **12**: 671-678, 1991.

BIERER TL, MERCHEN NR, ERDMAN JR. JW. Comparative absorption and transport of five common carotenoids in preruminant calves. *J Nutr*, **125**:1569-77, 1995.

BLAZEK, E. R. PEAK, J. G., PEAK M. J. J. Singlet oxygen induces frank strand breaks as well as alkali-labile and piperidine-labile sites in supercoiled plasmid DNA. *J Photochem Photobiol,* **49**, 607, 1989.

BLOCK G, PATTERSON B, SUBAR R. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, 18: 1-29, 1992. World Cancer Research Fund American Institute for Cancer esearch.Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington (DC): American Institute for Cancer Research 1997.

BODEPUDI, V., IDEN, C. R., JOHNSON, F. An Improved Method for the Preparation of Phosphoramidites of Modified 2'-Deoxynucleotides-Incorporation of 8-oxo-2'-Deoxy-7H-Guanosine into Synthetic Oligomers. *Nucleosides & Nucleotides* **10**, 755-761, 1991.

BOHM, F., TINKLER J. H., TRUSCOTT T. G. Carotenoids protec against cell menbrane damage by the nitrogen dioxide radical [letter]. *Nat Med* **1**:98-9, 1995.

BRADFORD, M .M. A rapid e sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**: 248-254, 1976.

BRAUGHLER, J.M., DUNCAN, L.A., CHASE, R.L. The involvement of iron in lipid peroxidation. Importance of ferric to ferrous ratios in initiation. *J Biol Chem*, **261**: 10282-10289, 1986.

BREIMER, L.H. Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol Carcinogen*, **3**: 188-197, 1990.

BRITTON, G. Struture and properties of carotenoids in relation to functions. *FASEB J*, **9**: 1551-1558, 1995.

BRIVIBA, K., KLOTZ, L.O. E SIES, H. Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological sistems *Biol Chem,* **378**, 1259, 39-41, 1997.

BRYANT, P.E. Enzymatic restriction of mammalian cell DNA using *Pvu* II and *Bam* H1: evidence for the double-strand break origin of chromosomal aberrations. *Int J Rad Biol*, **46**:57-65, 1984.

BRYANT, P.E., RICHES, A.C. Oncogenic transformation of murine C3H 10T1/2 cells resulting from DNA double-strand breaks induced by a restriction endonuclease. *Br J Cancer*, **60**: 852-854, 1989.

BURING J. E, HENNEKENS C. H. Beta-carotene and cancer Chemoprevention, *J Cel Biochem*, 226-230, Suppl. 22 1995.

BURNEY, P.G.J., COMSTOCK, G.W., MORRIS, J.S. Serologic precursors of cancer: serum micronutrients and the subsequent risk of pancreatic cancer. *Am J Clin Nutr* 49: 895-900,1989.

BURTON, G. W., AND INGOLD, K. U. Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*. **224**: 569-573, 1984.

CADET, J., BERGER, M., DOUKI, T., MORIN, B., RAOUL, S., RAVANAT, J. L., SPINELLI, S. Effects of UV visible radiation on DNA - Final base damage. *Biol Chem,* **378**, 1275, 1997.

CADET, J., TÉOULE R. Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals. *Photochem Photobiol*, **28**, 661-667, 1978.

CADET, J. *IN:* DNA ADDUCTS: Identification and Biological Significance, p. 245-276, IARC Scientific Publ. no. 125, *Int Agency Res Cancer*, Lyon, 1994.

CADET, J., CARVALHO, V. M., ONUKI, J., DOUKI, T., MEDEIROS. M. H. G ; DI MASCIO P. Purine DNA adducts of 4,5-dioxovaleric acid and 2,4-decadienal. In: DNA Cyclic Adducts (Singer, B. & Bartsch, H., eds). IARC Scientific Publications, No. 50. *Int Agency for Res Cancer*, Lyon. pp.103-113, 1999.

CARUGHI A, HOOPER, F. G. Plasma carotenoid concentration before and after supplementation with a carotenoid mixture. *Am J Clin Nutr*, **59**: 896-9, 1994.

CARVALHO, M. C., ASAHARA, F., DI MASCIO, P., ARRUDA CAMPOS, I.P., CADET, J. , MEDEIROS, M.H.G. Novel 1,N^2-Etheno-2'-deoxyadenosine Adducts from Lipid Peroxidation Products. *Chem Res Toxicol*, **13**, 397–405, 2000 .

CARVALHO, V. M. Adutos de DNA gerados por produtos da lipoperoxidação: Caracterização, detecção, incorporação em oligonucleotídeo e implicações biológicas, Tese de doutoramento, São Paulo, 2001.

CHEESEMAN, K.H. Mechanism and effects of lipid peroxidation. *Molec. Aspects Med.* **14**: 191-197, 1993.

CLINTON, S. K., EMENSHISER C., SCHWARTZ S. J., Cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinal in human prostate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **5**: 823-33, 1996.

CLINTON, S., K., Lycopene: Chemistry, Biology, and implications for human Health and disease. *Nutrition Reviews*, **56**: 2, 35–51, 1998.

COLLINS, R., A., GEDIK, M., C., OLMEDILLA, B., SOUTHON, S., BELLIZZI M. Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: Large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality. *FASEB*, **12**: 1397-1400. 1998.

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.*, **274**: 532-538, 1989.

DI MASCIO, P.; SUNDQUIST, A.; DEVASAYAM, T. A.; SIES, H., Reaction of peroxynitrite and hydrogen peroxide to produce singlet molecular oxygen (1delta g). *Methods Enzymol.*, **269**: 395-400, 1996.

DI MASCIO, P., MENCK, C.F.M., NIGRO, R.G., SARASIN, A. SIES, H. Singlet molecular-oxygen induced mutagenicity in mammalian SV40-based shuttle vector. *J Photochem Photobiol*, **51**, 293, 1990.

DI MASCIO, P., MEDEIROS M. H. G., BECHARA E. J. E., CATALANI L. H. Singlet Molecular Oxygen: Generation, Reactivity, Identification

and Biological Effects. *Ciên Cult,* **47**, 297-331, 1995.

DI MASCIO, P., SIES, H. Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4 naphthylidene)dipropionate – monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane. *J Am Chem Soc.* 111(8) 2909-2914, 1989.

DI MASCIO, P., WEFERS, H., DO-THI, H-P., LAFLEUR, M. V. M., SIES, H. *Biochem. Biophys. Acta* 1007, **151**, 1989.

DIXON Z. R, BURRI B. J, CLIFFORD A. J. Effects of a carotene deficient diet on measures of oxidative susceptibility and superoxide dismutase activity in adult women. *Free Radic Biol Med*; **17**: 537-44 1994.

DREHER, D., JUNOD, A. F. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer*, **32A**: 30-38, 1996.

DUARTE, V., GASPARUTTO D, YAMAGUCHI L. F., RAVANAT J. L., MARTINEZ G. R., MEDEIROS M. H. G., DI MASCIO P., CADET J. Oxalaluric acid as the major products of singlet oxygen-mediates oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in dna. *J Am Chem Soc* 122:(51) 12622-12628, 2000.

EBINA, Y., OKADA, S., HAMAZAKI, S., OGINO, F., LI, J-L., MIDORIKAWA, O. Nephrotoxicity and renal cell carcinoma after use of iron- and aluminum- nitrilotriacetate complexes in rats. *J Natl Cancer Inst.*, **76**: 107-113, 1986.

EL-GORAB MI, UNDERWOOD BA, LOERCH JD. The roles of bile salts in the uptake of carotene and retinol by rat everted gut sacs. *Biochim Biophys Acta*, **401**: 265-77, 1975.

ERDMAN J, J. W., BIERER T. L, GUGGER E. T. Absortion and transport of carotenoids in: Canfield LM, Krisnk NI, Olson JA, eds. Carotenoid in human health, vol **691**. *New York Academy of Sciences*, 76-85, 1993.

ESTERBAUER, H. CHEESEMAN. Determination of aldehyde lipid peroxidation products: Malonaldhyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzimol.* **186**: 407-421, 1990.

FARGION, S., MATTIOLI M., FRANCANZANI A. L. AND FIORELLE G.

Iron and liver diseases. *Can J Gastroenterol. 14* suppl D 89D-92D, 2000.

FIALA, E. S., CLIFFORD CONNAWAY, C. E., MATHIS, J. E. Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Res.* **49**: 5518-5522, 1989.

FLOYD, R. A., WEST, M. S., ENEFF, K. L., HOGSETT, W. E., TINGEY, D. T.Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in isolated DNA. *Arch Biochem Biophys*, **262**: 266-272, 1988.

FOOTE, C.S., AND DENNY, R.W. Chemistry of Singlet Oxygen 7 Quenching by Beta-carotene. *J Am Chem Sci.* **90**: 6233-6235, 1968.

FORSBERG, A. CHER. LINGEN, L., ERNSTER O. LINDBERG. Modification of the X-irradiation sydrome by lycopene. *Experimental Cell Research*, **16**:7-14, 1959.

FUKUZAWA, K., TADOKORO, T., KISHIKAWA, K., MUKAI, K., and GEBICKI, J.M. Site-specific induction of lipid peroxidation by iron in charged micelles. *Arch. Biochem. Biophys.*, **260**: 146-152, 1988.

GANN, P. H., MA, J., GIOVANNUCCI, E., WILLET, W., SACKS, F., HENNEKENS, C. H. A prospective analysis of plasma antioxidante and prostate cancer risk. [abstract]. *Proc Am Assoc Cancer Res* **39:89**, 1998.

GARTNER C, STAHL W, SIES H. Lycopene is more bioavalable from tomato paste than fresh tomatoes. *Am J Clin Nutr.*, **66**: 116-22, 1993.

GERSTER H. The potential role of lycopene for human health. *J Am Nutr*, **16**: 109-26, 1997.

GILHAM, P. T., KHORANA, H. G. Studies on Polynucleotides.5. Stepwise synthesis of Oligonucletides – Syntheses of Thymidyl-(5'-]3')-Thymidyl(5'-]3')-Thymidine and Deoxycytidylyl-(5'-]3')-Deoxyadenylyl-(5'-]3')-Thymidine. *J Am Chem Society* **81**, 4643-4650, 1959.

GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, Tomato-Based Products, Lycopene, and Cancer: Review of the Epidemiologic Literature. *J Natl Cancer Inst* **91**, 317-331, 1999.

GIOVANNUCCI, E., ASCHEIRIO, A., RIMM, E.B., STAMPFER, M.J., DOLDITZ, G.A., WILLTT, W.C., Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, **87**: 1767-1776, 1995.

GIROTTI, A.W., THOMAS, J.P. Damaging effects of oxygen radicals on resealed erythrocyte ghosts. *J Biol Chem*, **259**: 1744-1752, 1984.

GODDARD, J.G., SWEENEY, G.D. Ferric nitrilotriacetate: A potent stimulant of *in vivo* lipid peroxidation in mice. *Biochem Pharmacol*, **32**: 3879-3882, 1983.

GODDARD, J.G., BASFORD, D., SWEENEY, G.D.Lipid peroxidation stimulated by iron nitrilotriacetate in rat liver. *Biochem Pharmacol*, **35**: 2381-2387, 1986.

GOODMAN D. S, OLSON J. A. The conversion of all-trans-β-caroteno into retinal. In: *Methods in enzymatic*, vol **15**. New York: Academic Press, 462, 1996.

GOODMAN DS, BLOMSTRAND R, WERNER B. The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and β-carotene in man. *J Clin Invest*; **45**: 1615-1623, 1966.

GOULINET S, CHAPMAN M. J. Plasma LDL and HDL subspeces are heterogenuos in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids: relevance to oxidative registence and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **17**: 786-96, 1997.

GROSS MD, PRUOTY CB, JACOBS DR. Stability of carotenoids and alpha-tochopherol during blood collection and processing procedures. *Clin Chem.,* **41:** 943, 1995.

GROSS, J. Pigments in fruits. *Academic press*, London, 1987.

GROSS, J. Pigments in vegetables, Van Nordstrand Reinhold, New York. 1991.

GUPTA, R. C. Nonrandom binding of the carcinogem N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo*. *Proc Natl Acd Sci*, **81**: 6943-6947, 1984.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. *In* Free Radicals in Biology and Medicine. 3.ed. pp.1-936, Oxford University Press, New York 1999.

HALLIWELL B., HOULT J.R.S., BLAKE D.R. Oxidants, inflammation and anti-inflammatory drugs. *FASEB J*; **2:** 501-518, 1988.

HALLIWELL, B. GUTTRIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metals in human disease: an overview. In Packer, L. and Glazer, A.N. (eds), Methods in Enzymology: Oxygen Radicals in Biological systems, Part B, Oxigen Radicals and Antioxidants. Academic Press, San Diego, vol. **186**: 1-85, 1990.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research.* **9**: 1-32, 1990.

HAMAZAKI, S., OKADA, S., EBINA, Y., FUJIOKA, M., MIDORIKAWA, O. Nephrotoxicity of ferric nitrilotriacetate: an electron microscopical and metabolic study. *Am J Pathol.*, **123**: 343-350, 1986.

HAMAZAKI, S., OKADA, S., EBINA, Y., MIDORIKAWA, O. Acute renal failure and glucosuria induced by ferric nitrilotriacetate in rats. *Toxicol. Appl Pharmacol.*, **77**: 267-274, 1985.

HAMAZAKI, S., OKADA, S., LI, J.L., TOYOKUNI, S., MIDORIKAWA, O. Oxygen reduction and lipid peroxidation by iron chelates with special reference to ferric nitrilotriacetate. *Arch Biochem Biophys*, **272**: 10-17, 1989.

HART, D. J., SCOTT, J. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in Food, and the measuriment of the carotenoid content of vegetables and fruits communly consumed in the UK. *Food Chem*, **54**, 101-111, 1995.

HART, D. J., SCOTT, K. J. Development and evaluation of An HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and mesurement of the carotenoid content of vegetables and fruits. *Food Chem.*,**54**: 101-111, 1995.

HARTWIG, A., KLYSZCZ-NASKO H., SCHLEPEGRELL, R. BEYERSMANN, D. Cellular damage by ferric nitrilotriacetate and ferric citrate in V79 cells-in ferrelationship between lipid-peroxidation, DNA stand breaks and sister chromatid exchanges. *Carcinogenesis,* **14**: 1, 107-112, 1993.

HATAHET, Z., PURMAL, A. A., WALLACE, S. S. A Novel Method for Site Specific Introduction of single Model Oxidative DNA lesions into Oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Research* **21**, 1563-1568, 1993.

HELBOCK, H. J., BECKMAN, k., B., SHIGENAGA,M.K., WALTER, B., P.,WOODALL, A., YEO, C. H., AMES, N.B. DNA oxidation matters: The HPLC–Electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine., *Proc Natl acad Sci.* USA, **95**: 288-293, 1998.

HELZLSOUER, K.J., COMSTOCK, G.W., MORRIS, J.S. Selenium, lycopene, alfatocopherol, beta-carotene, retinol, and subsequent bladder cancer. *Cancer Res.* **49**: 144-164, 1989.

HIGINBOTHAM, K.G., RICE, J.M., DIWAN, B.A., KASPRZAK, K.S., REED, C.D., PERANTONI, A. O. GGT to GTT transversions in codon 12 of the K-*ras* oncogene in rat renal sarcomas induced with nickel subsulfide or nickel subsulfide/iron are consistent with oxidative damage to DNA. *Cancer Res.*, **52**: 4747-4751, 1992.

HIRAYAMA, O.; NAKAMURA, K.; HAMADA, S.; KOBAYASHI, Y. Singlet oxygen quenching ability of naturally-occorring carotenoids. *Lipids*, **29**:2, 149-150, 1994.

HIRAYAMA, O.; NAKAMURA, K.; HAMADA, S.; KOBAYASHI, Y.; Singlet oxygen quenching ability of naturally-occorring carotenoids. *Lipids* , **29**:2, 149-150, 1994.

HOLLANDER D, RUBLE PE. Beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport. *Am j Physiol*, **235**: E686-91, 1978.

HOTZ-WAGENBLATT, A. SHALLOWAY, D. Gap junctional communication and neoplastic transformation. *Crit Rev Oncog.*, **4**: 541-558, 1993.

HOWARD, J. A. Homogenous liquid-phase aotoxidation. In kochi, J.K. (ed) Free Radicals Volume II. Wile-Interscience, New York, pp. 3-62, 1973.

HSING A. W., COMSTOCK, G. W., ABBEY, H., POLK, B. F. Serologic precursor of cancer: Retinol, caretonoids and tocopherol and risk of prostate cancer. *J. Natl Cancer Inst,* **82**, 941-6, 1990.

INOUE, S., KAWANISHI, S. Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide. *Cancer Res.*, **47**:522-6527, 1987.

INOUYE, S. Site-specific cleavage of double-strand DNA by hydroperoxide of linoleic acid. *FEBS Lett.*, .**172**: 231-232, 1984.

IQBAL, M., GIRI, U., ATHAR, M. Ferric nitrilotriacetate (Fenta) is a potent hepatic tumor promote and acts thrugh the generation of oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**: 557-563, 1995.
J. Photochem. Photobiol B Biol. **6**: 359-371, 1990.

JIANG Z. Y, HUNT J. V, WOLFF S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xilenol orange for detectin of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem*, **202**: 384-389, 1992.

KAPLAN, L. A., LAU, J. M., STEIN, E. A., Carotenoids composition, concentration and relationships in variou human organs. *Clin Physiol Biochem*, **8**, 1-10, 1990.

KENNEDY, T. A., LIEBLER, D. C. Peroxyl radical oxidation of Beta-carotene-Formation of Beta-carotene Epoxides. *Chem Res Toxicol*, **4**: 290-295, 1991.

KHACHIK F, SPANGLER C. J, SMITH J. C JR,. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human mil and serum. *Anal Chem.*, **69**: 1873-81, 1997

KHACHIK, F., RICHIE, J. P.JR., COHEN, L.A,. Licopene uptake and tissue disposition in and female rats. *Exp Biol Med*, **218**:(2), 109-114, 1998.

KIM D. J., TAKASUKA N., KIM J. M., SEKINE K., OTA T., ASAMOTO M. Human serum carotenoid concentrations are related to physiologic and life-stile factors. *J Nutr* ,**126**: 129-37, 1996.

KOONSVITSKY BP, BERRY D, JONES M.B. Olestra effects serum concetration of α-tocoferol e carotenoids but not vitamin D or vitamin K status in free-living subjetcts. *J Nutr*, **127**: 1636S-1645S, 1997.

KRASNOVSKII, A. A.; SUKHORUKOV, VL, POTAPENKO AIA. Photogeneration of singlet oxygen by psoralens. *Biull Eksp Biol Med.* SEP; **96**:9, 59-61, 1983.

KRINSKY N. I., RUSSETT, M. D. HANDELMAN, G. J. SNODDERLY, D. M. Structural and geometrical isomers of carotenoids in human plasma. *J Nutr.*, **120**: 1654-62, 1990.

KRINSKY NI, CORNWELL D.G, ONCLEY JL. The transport of vitamin A and carotenoids in human plasma. *Arch Biochem Biophys*, **73**: 233-46, 1958.

KRINSKY, N. I. Antioxidant function of carotenoids. *Free Radicals Biol. Med.* **7**: 617-635, 1989.

KRINSKY, N. I. Effects of carotenoids in cellular and animal systems. *Am. J Clin Nutr*, **53**: 2385-2465, 1991.

KRINSKY, N.I., WANG, X. D., TANG, G. W., RUSSEL, R. M*in* Retinoids: Progress in research and clinical application [Livrea, M. A., and Parcker, L., Eds.], pp, 1-16 Dekker, New York, 1993.

KRINSKY, N. I. Actions of carotenoids in biological systems. *Ann Rev Nutr* **13**:561-587, 1993.

KUCHINO, Y., MORI, F., KASAI, H., INOUE, H., IWAI, S., MIURA, K., OHTSUKA, E., NISHIMURA, S. DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine are misread both at the modified base and at adjacent residues. *Nature*, **327**: 77-79, 1987.

LEVY, J., BOSIN E., FELDMAN B., GIAT Y., MIINSTER A., DANILENKO M., SHARONI Y. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell-proliferation than alpha-carottene or Beta-carotene. *Nutr Cancer*, **24**: 257-266, 1995.

LI, B. F., REESE, C. B., SWANN, P. F. Synthesis and Characterization of Oligodeoxynucleotides Containing 4-O-Methylthimine. *Biochemistry* **26**, 1086-1093.

LI, J. L., OKADA, S., HAMAZAKI, S., EBINA, Y., MIDORIKAWA, O. Subacute nephrotoxicity and induction of renal cell carcinoma in mice treated with nitrilotriacetate. *Cancer Res.*, **47**: 1867-1869, 1987.

LIU, Y. K., LUH, B. S. Effects of Harvest maturety on carotenoids in pastes made from VF-145-7879 tomatos. *J. Food*, **42**: 216-220, 1977.

LOUREIRO, A. P., DI MASCIO, P., GOMES, O. F. , MEDEIROS, M.H.G. *trans, trans*-2,4-Decadienal-Induced 1,N^2-Etheno-2'-deoxyguanosine Adduct Formation. *Chem Res Toxicol*, *13*, 601-609, 2000.

LOWE, G.M., BOOTH, L.A., YOUNG, A.J. BILTON, R.F. Lycopene and β-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentration but rapidly lose this capacity at higher doses. *Free Rad Res*. **30**, 141-151, 1999.

MACHLIN, L. J. Critical assessment of the epidemiological data concerning the impact of antioxidant nutrients on câncer and cardiovascular disease. *Crit Ver Food Sci Nutr,* **35**:41-50, 1995.

MANGELS, A. R., HOLDEN, J. M., BEECHER, G. R., FORMAN, M. R. LANZA, E. Carotenoids contente of fruits and vegetables-An evaluation of analytic data. *J Am Diet Assoc*, **93**: 284-296, 1993.

MALINS D. C., POLISSAR N. L. GUNSELMAN S. J. Models of DNA struture achieve almost perfect discrimination between normal prostate, benign prostatic hyperplasia (BPH), and adenocarcinoma and have a high potential for predicting BPH and prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci* USA, **94**: 259-64, 1997.

MARTINEZ, G. R., RAVANAT, J. L., MEDEIROS, M. H. G., CADET, J DI MASCIO P. Synthesis of a Naphthalene Endoperoxide as a Source of ^{18}O-labeled Singlet Oxygen for Mechanistic Studies *J Am Chem Soc*, **122**, 10212-10213, 2000.

MATHEWS-ROTH, M. M., WELANKIWAR, S., SEHGAL, P. K., LAUSEN, N. C. .G., RUSSET, M., KRINSKY, N. I. *J. Nutr.* **120**: 1205-1213, 1990.

MATHEWS-ROTH M. M. Lack of genotoxicity with beta-carotene. *Toxicol. Lett.* **41**: 185-191. 1988.

MATSURA, R. Uptake of iron and nitrilotriacetate (NTA) in rat liver and the toxic effect of Fe-NTA. *Acta Med. Okayama*, **37**: 393-400, 1983.

MENEGHINI, R. BENFATO M. S., BERTOCINI C. R., CARVALHO H., GURGUEIRA S. A., ROBALINHO R. L., TEIXEIRA H. D., WENDEL C. M. A., NASCIMENTO A. L. T. O. Iron homeostasis and oxidative DNA damage (Review). *Cancer J*, **8**: 3, 1995.

MCBRIDE, L. J., CARUTHERS, M. H. Nucleotide chemistry.10. An Investigation of several Deoxyoligonucleoside. *Tetrahedron Letters* **24,** 245-248, 1983.

MICHAELS, M. L., JOHNSON, D. L., REID, T. M., KING, C. M., ROMANO, L. J. Evidence for in Vitro Translesion DNA Synthesis Past a Site-Specifi Aminofluorene Adduct. *J Biol Chem,* **262**, 14648-14654, 1987.

MICOZZI MS, BROWN ED, EDWARDS B.K. Plasma carotenoid response to chronic intake of selected foods and β-carotene supplements in men. *Am J Clin Nutr.*, **55**: 1120-5, 1992.

MINOTTI, G., AND AUST, S.D. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids*, **27**: 219-226, 1992.

MINOTTI, G., and AUST, S.D. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J Biol Chem,* **262**: 1098-1104, 1987.

MO, F. X-ray crystallographic studies. In carotenoids. Vol. 1B: Spectroscopy. (Britton, S. Lieaaen-Jensen, H. Pfander, eds.), pp. 321-324. Birkhäuser, Basel, 1995.

MOBARHAN S, BOWEN P, ANDERSEN B. Effects of Beta-carotene repletion on Beta-carotene absorption, lipid peroxidation, and neutrophil superoxide formation in young men. *Nutr Cancer*, **14**: 195-206, 1990.

MOTTOLA, H.A. Nitrilotriacetic acid as a chelating agent: applications, toxicology, and bio-environmental impact. *Toxicol Environ Chem Rev*, **2**: 99-161, 1974.

NAIR, U.J., FLOYD, R.A., NAIR, J., BUSSACHINI, V., FRIESEN, M., BARTSCH, H. Formation of reactive oxygen species and of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA *in vitro* with betel quid ingredients. *Chem Biol Interactions*, **63**: 157-169, 1987.

NIERENBERG, D. W., NANN, S. L. A method for determinig concentration of retinal, tocopherol, and 5 carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr.*, **56**: 417-426, 1992.

NOVOTNY JA, DUEKER SR, ZECH L.A. Compartmental analysis of the dynamics of β-carotene in an adult volunteer. *J Lipid Res.*, **36**: 1825-38, 1995.

OJIMA, F., SAKAMOTO, H., ISHIGURO, Y., TERAO, J. Consumption of carotenoids in photosensitized oxidation of human plasma Low-density lipoprotein. *Free Radicals Biol Med*, **15**: 377-384, 1993.

OKADA, S. Iron-induced tissue damage and cancer: the role of reactive oxygen species-free radicals. *Pathol Int*, **19**: 339-347, 1995.

OKADA, S., FUKUNAGA, Y., HAMAZAKI, S., YAMADA, Y., TOYOCUNI, S. Sex differences in the localization and severity of ferric nitrilotriacetate-induced lipid peroxidation in the mouse kidney. *Acta Pathol. Japon.*, **41**: 221-226, 1991.

OKADA, S., HAMAZAKI, S., EBINA, Y., FUJIOKA, M., MIDORIKAWA, O. Nephrotoxicity and induction of the renal adenocarcinoma by ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) in rats. *Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins*. In: Urushizaki, I., Aisen, P., Litowsky, I., Drysdale, J.W., eds New York: ELsevier, 473-478, 1983.

OKADA, S., HAMAZAKI, S., EBINA, Y., LI, J-L, and MIDORIKAWA, O. Nephrotoxicity and its prevention by vitamin E in ferric nitrilotriacetate-promoted lipid peroxidation. *Bioch Biophys Acta*, **922**: 28-33, 1987.

OKADA, S., MINAMIYAMA, Y., HAMAZAKI, S., TOYOKUNI, S., SOTOMATSU, A. Glutathione cycle dependency of ferric nitrilotriacetate induced lipid peroxidation in mouse proximal renal tubules. *Arch Biochem Biophys*, **301**: 138-142, 1993.

OWENS, C.W AND. BELCHER, R. V. A colorimetric Micro-Method for determination of Glutathione. *Biochem Journ.*, **94**: 705-& 1965.

PARK, J. W., FLOYD, R.A. Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA, *Free Radical Biol Med*, **12**: 245-250, 1992.

PARKER, R. S. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J*; **10**: 542-51, 1996.

PETO R, DOLL R, BUCKLEY J. D, SPORN M.B. Can diatery Beta-carotene materially reduce humana cancer rates? *Nature*, **290**: 201-208, 1981.

PLACER, Z. , CUSHMAN, L., AND JOHNSON, B. C. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems, *Anal Biochem*, **16**: 59-364, 1966.

POOR CL, BIERER T. L, MERCHEN N. R. The accumulation of α and β-carotene in serum and tissues from preruminant calves fed raw and steamed carrot slurries. *J Nutr.* **123**: 1296-304,1993.

PORTER, N.A. Mechanisms for the autoxidation of polyunsatirated lipids. *Chem Res*, **19**: 262-268, 1986.

PREECE, N.E., EVANS, P.F., HOWARTH, J.A., KING, L.J., and PARKE, D.V. The induction of autoxidative tissue damage by iron nitrilotriacetate in rats and mice. *Toxicol Applied Pharmacol* **93**: 89-100, 1988.

PRESTON, B. D., SINGER, B., LOEB, L. A. Comparison of the Relative Mutagenicities of O-Alkylthymines Site-Specifically Incorpored into Phi X174 DNA. *J Biol Chem,* **262**, 13821-13827, 1987.

PRESTON, B. D., SINGER, B., LOEB, L. A. Mutagenic Potential of O4-Methylthymine in Vivo Determined by an Enzymatic approach to Site-Specific Mutagenesis. *Proc Nati Acad Sci,* **83**, 8501-8505, 1987.

PUNG, A.; RUNDHAUG, J. E.; YOSHIZAWA, C. N.; BERTRAM, J. S. Beta-carotene and canthaxanthin inhibit chemically-induced and physically induced neoplastic transformation in 10T1/2 cells. *Carcinogenesis* **9**: 1533-1539, 1988.

RAO, A.V., AGARWAL, S. R. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. *Nutrit Res*, **19**, 2, 305-323, 1999.

RAVANAT, J. L., DI MASCIO, P., MARTINEZ, G.R., MEDEIROS, M. H. G., CADET J. Singlet oxygen Induces Oxidation of cellular DNA. *J Biol Chem,* **275**, 37518-37523, 2000.

RIBEIRO, D.T., MADZAK, C., SARASIN, A., DI MASCIO, P., SIES, H. Singlet oxygen induced damage and mutagenicity in a single-

stranded SV40-based shuttle vector *J Photochem. Photobiol.* **55**, 1, 39-45,1992.

REICH, P., SCHWACHMAN, H. CRAIG, J. M. Lycopenemia-A Variant of Carotenemia, *N Engl J Med.* **262**: 263-269, 1960.

REISS, U., TAPPEL, A.L. Fluorescent product formation and changes in structure of DNA reacted with peroxidizing arachidonic acid. *Lipids* **8**: 199-202, 1973.

RIPPLE M. O., HENRY W. F., RAGO R. P. WILDING G. Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 89: 40-8, 1997.

RISO, P., PINDER, A., SANTANGELO, A., PORRINI, M. Does tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage? *Am J Clin Nutr*, **69**: 712-718, 1999.

ROCK C.L, SWENDSEID M.E, JACOB R.A, MCKEE R.W. Plasma carotenoid levels in human subjects fed a low carotenoid diet. *J Nutr.* **122**: 96-100, 1992.

ROISER, J.A., PETEGHEM, H.W. Peroxidation *in vitro* metabolism of dethylstilbestrol induces formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Carcinogenesis,* **10**: 405-406, 1989.

SAMUNI, A., CHEVION, M., CZAPSKI, G. Unusual copper-induced sensitization of the biological damage due to superoxide radicals. *J Biol Chem,* **256**: 12632-12635, 1981.

SANDER, L., SHARPLESS K. CRAFT, N., WISE, S. Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers. *Anal Chem*, **66**: 1667-1674, 1994.

SARKER, A. H., WATANABE, S., SEKI, S., AKYAIM, T., OKADA, S. Oxygen radical-induced single strand DNA breaks and repair of the damage in cell-free system. *Mutat Res*, **337**: 85-95, 1995.

SCHAICH, K.M., BORG, D.C. Fenton reactions in lipid phases. *Lipids* **23:** 570-579, 1988.

SCHALLER, H., WEIMANN, G., KHORANA, H. G., LERCH, B. Studies on Polynucleotides.24. Atepwise Synthesis of Specific Deoxyribopolynucleotides (4) – protected Derivatives of

Deoxyribonucleosides and New synthesis of Deoxyribonucleoside-3 Phosphate. *J Am Chem Soc,* **85**, 3821-&, 1963.

SHEU, C., FOOTE C. S. Reactivity toward singlet oxigen of a 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) formed by photooxidation of guanosine derivative. *J Am Chem Soc.* 117 (24), 6439-6442, 1995.

SCHIERLE, J., BRETZEL, W., BÜHLER, I., FACCIN, N., HESS, D., STEINER, K., SCHÜEP, W. *Food chem.* 1996.

SCHIMITZ, H. H., POOR, C. L., WELLEMAN, R. B., ERDMAN, J. W. Concentrations of selected carotenoids and vitamin-A in human lives, kidnei and lung-tissue. *J Nutr*, **121**: 1613-1621, 1991

SCHURTER, E. J., SAYER, J. M., OH-HARA, T., YEH, H. J., YAGI, H., LUXON, B. A. JERINA, D. M., GORENSTIENS, D. G. Nuclear magnetic Resonance Solution Structure of an Undecanucleotide Duplex With a Complementary Thymidine Base Opposite a 10R Adduct Derived From Trans Addition of a Deoxyadenosine N6-Amino Group to (-)-(7R,8S,9R,10S)-7,8-Dihydroxy-9,10-Epoxy-7,8,9,10-Tetrahydrobenzo[a]Pyrene. *Biochemistry* **34**, 9009-9020, 1995.

SCHURTER, E. J., YEH, H. J., SAYER, J. M., LAKSHMAN, M. K., YAGI, H., JERINA, D. M., GORENSTEIN, D. G. NMR Solution Structure of a Nonanucleotide Duplex With a DG Mismatch Oppsite a 10R Adduct Derived From Trans Addition of a Deoxyadenosine N6-Amino Group to (-)-(7S,8R,9R,10S)-7,8-Dihydroxy-9,10-Epoxy-7,8,9,10-Tetrahydrobenzo[a]Pyrene. *Biochemistry* **34**, 1364-1375, 1995.

SHIBUTANI, S., SUZUKI, N., GROLLMAN, A. P. Mutagenic Specificity of (Acetylamino)Fluoren-Derived DNA Addcts im Mammalian Cells. *Biochemistry* **37**, 12034-12041, 1998.

SHULHOF, J. C., MOLKO, D., TEOULE, R. Facile Removal of New Base Protecting Groups Useful in Oligonucleotide synthesis. *Tetrahedron Letters* **28**, 51-54, 1987.

SHULHOF, J. C., MOLKO, D., TEOULE, R. The final Deprotectiona Step in Oligonucleotide Synthesis Is Reduced to a Mild and Rapid Ammonia

Treatment by Using Labile Base-Protecting Groups. *Nucleic Acids Research* **15**, 397-416, 1987.

SIES, H. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection *Mut. Res.* **299**, 183, 1993.

SIES, H., AND KRINSKY N. I. Antioxidants vitamins and β-caroten in disease prevention. *Am J Clin Nutr* **62**:77-85, 1995.

SIES, H., STAHL, W. Vitamin-E and Vitamin-C, Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr*, **62**: 1315S-1321S, 1995.

SIMONART T, VAN VOOREN J. P., PARENT D., HEENEN M., Boelaert J. R. Role iron in dermatology. *Dermatology* **200**(2): 156-9, 2000.

SINGER B., CHAVES, F., GOODMAN, M. F. ESSIGMANN, J. M., DONAJH, M. K. Effect of 3' Flanking Neighbors on Kinetics of Pairing of DCTP or DTTP Opposite O6-Methylguanine in a Defined Primed Oligonucleotide When Escherichia Coli DNA Polymerase I Is Used. *Proc Nati Acad Sci States Ame* **86**, 8271-8274, 1989.

SINHA, N. D., BIERNAT, J., KOSTER, H. Beta-Cyanoethyl N,N-Dialkylamino/N-Morpholinomonochloro Phosphoramidites, New Phosphitylating Agents Facilitating Ease of Deprotection and Work-Up of Synthesized Oligonucleotides. *Tetrahedron Letters* **24,** 5843-5846, 1983.

SCHMITZ, H. H., POOR C. L., WELLMAN R. B. ERDMAN J. W. JR. Concentration of selected carotenoids and vitamin A in human liver, kidney and lung tissue. *J Nutr* **121**:1613-21, 1991.

SPRATT, T. E., CAMPBELL, C. R. Synthesis of Oligodeoxynucleotides Cantainning Analogs of O6-Mthyguanine and Reaction With O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase. *Biochemistry* **33**, 11364-11371, 1994.

STAHL, W. SIES, H. Uptake of lycopen and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in human. *J. Nutr,* **122**: 2161-6, 1992.

STAHL, W. SIES, H. The role of carotenoids and retinoids in gap junctional communication. *Int J Vit Nutr Res.* **68**: 354-359, 1998.

STAHL, W., SCHWARTZ, W., SUNDQUIST, A., R., SIES, H. Cis-Trans isomers of lycopene and Beta-carotene in human serun and tissue. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**: 173-177, 1992.

STAHL, W.; SIES, H., Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Arch. Biochem. Biophys.* **336**, 1-9, 1996.

STEIMETZ KA, PORTTER J.D. Vegetables, fruits, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control* **2**: 325-57, 1991.

STEVEN K. CLINTON. Lycopene: Chemistry, Biology, and implications for human health and disease. *Nutrition Reviews* **56**:(2), 35-51, 1998.

STRAUB, O. Key to carotenoids, 2and Edn (H. Pfander, ed.) Birkhäuser, Basel, 1987.

TACHON, P. GIANCOMONI, P. U., Histidine moduletes the clastogenic effect of oxidative stress. *Mutation Res*, **211**: 103-109, 1989.

TAVARES, C. A. AND RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., LEBENSM. Carotenoid composition of Brazilian tomatos an tomato products. *Food Sci Tecnol.* **27**: 219-224, 1994.

The α-tocopherol, β-carotene Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and β-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med* **330**:1029-35, 1994

TONUCCI, L.H., HOLDEN, J. E., BEECHER, G. R., KHACHIK, F., DAVIS C. S., MULOKOZI, G Carotenoid content of thermally processed tomato-based food-products. *J Agric Food Chem.* **43**: 579-586, 1995.

TOYOKUNI, S., SAGRIPANTI, J.-L. DNA single- and double-strand breaks produced by ferric nitrilotriacetate in relation to renal tubular carcinogenesis. *Carcinogenesis* **14**: 223-227, 1993.

TOYOKUNI, S., MORI, T., DIZDAROGLU, M. DNA base modifications in renal chromatin of wistar rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Int. J. Cancer* **57**: 123-128, 1994.

UKAI, N., Y., ETOH, H., YAGI, A., INA, K., OSHIMA, S., OJIMA, F., SAKAMOTO, H., ISHIGURO, Y. Photosensitized oxigenation of lycopene. *Biosci. Biotech. Bioch.* **58**: 1718-1719. 1994.

UMEMURA, T., SAI, K., TAKAGI, A., HASEGAWA, R., KUROKAWA, Y. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) in rat kidney

DNA after intraperitoneal administration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA). *Carcinogenesis*, **11**: 345-347, 1990.

VACA, C.E., WILHELM, J., HARMS-RINGDAHL, M. Interection of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mut Res.* **195**: 137-149, 1988.

VAN DEN BERG, H., FAULKS R., FERNANDO G. H., HIRCHBERG J., OLMEDILLA B., SANDMANN G., SOUTHON S. STAHL, W. The potential for the improvemment of carotenoids levels in food and the likely systemic effects (Review). *J Sci Food Agric* **80**:880-912, 2000.

VAN POPPEL G., GOLDBOHM, R.A. Epidemiological evidence for beta-carotene and cancer prevention. *Am J Clin Nutr.* **62**: S1393-S1402, 1995.

VAN VLIET T, VAN VLISSINGEN M.F, VAN SCHAIK F, VAN DEN BERG H. β-carotene absorption and cleavage in rats is affected by the vitamin A concentration of diet. *J Nutr.*, **126**: 499-508, 1996.

VAN VLIET, VAN SCHAIK F, SCHREURS WHP, VAN DEN BERG H. In vitro measurement of β-carotene cleavage activity: methodological considerations and the effect of other carotenoids on β-carotene cleavage. *Int J Vitam Nutr Res.*, **66**: 77-85, 1996.

VANEENWYK, J., DAVIS, F. G., BPWEN, P. E. Diatery and serum carotenoids and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* **48**, 34-8, 1991.

WAGNER, B.A., BUETTNER, G. R E BURNS, C. P. Free radical-mediated lipd peroxidation in cell: oxidazability is function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry*, **33:** 4449-4453, 1994.

WANG X.D, TANG G.W, FOX J.G, Enzimatic conversion of β-carotene into apo-carotenals and retinoids by human, monkey, ferret, and rats tissues. *Arch Biochem Biophys*, **285**: 8-16, 1991.

WANG, L., HIRAYASU, K., ISHIZAWA, M. E KOBAYASHI, Y. Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acids Res.*, 22: 1774–1775, 1994.

WISEMAN H., HALLIWELL B. Damage to DNA by reaticve oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* **313**:17-29, 1996.

WEISS ST. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.*, **320**: 365-376, 1989.

WORLD CANCER RESEARCH FUND AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington (DC): *Am Inst Cancer Res*; 1997.

YAMADA, M., AWAI, M., OKIGAKI, T. Rapid *in vitro* transformation system for liver epithelial cells by iron chelate, Fe-NTA. *Cytotechnology*, **3**: 149-156, 1990.

YAMAGUCHI, R., HIRANO, T., ASAMI, S., CHUNG, M. H., SUGITA, A. AND KASAI, H. Increased 8-Hydroxyguanine levels in DNA and its repair activity in rat kidney after administration of renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Carcinogenesis,* **17**: 2419-2422, 1996.

YAMANOI, Y., AWAI, M., and SENO, S. Degrannulation effect of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) on the pancreatic islet β-cells: Its acute toxic effect on glucose metabolism. *Acta Med. Okayama*, **38**: 423-438, 1984.

YEUM K. J., BOOTH S. L., SANDOWSKI J. A., et al. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *Am J Clin Nutr*, **64**: 594-602, 1996.

YUNG, A., AND BRITTON, G. Carotenoids in photosynthesis, Chapman & Hall, London e Armstrong, G. A., and Hearst, J. E. *FASEB J.* **10**: 228-237, 1996.

ZHANG, L. X., COONEY, R. V.; BERTRAN, J. Carotenoids up-regulate connexin 43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res.,* **52**: 5707-5712, 1992.

ZHANG, L. X., COONEY, R. V.; BERTRAN, J., Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis,* **12**: 2109-2114. 1991.

ZHAO, Z., KHACHIK, F., RICHIE, J. P., COHEN, L. A. Lycopene uptake and tissue disposition in male and female rats. *Proc. Soc*

. *Exp Biol Med*, **218**: 109-114, 1998.

ZHOU JR, GUGGER E. T, ERDMAN JR. J. W. The crystaline form of carotenoids and the food matrix in corrot root decrease the relative bioavalability of β-and α-carotene in the ferret model. *J Am Coll Nutr*. **15**: 84-91, 1996.

ZUMBRUNN, A., UEBELHART, P., AND EUGSTER, C. H. HPLC of carotenes with Psi-End groups and (Z) configurationat terminal conjugated double-bonds-isolation of (5Z) lycopene from tomatos. *Helv. Chim. Acta* **68**: 1540-1542, 1985.