

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

*Lesões em DNA promovidas por produtos de
oxidação do β -caroteno: Possíveis
implicações biológicas*

Sabrina de Almeida Marques

**Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica**

Profa. Dra. Marisa H. G. Medeiros

Orientadora

São Paulo, 11 de maio de 2005.

“Lesões em DNA promovidas por produtos de oxidação do β -caroteno: possíveis implicações biológicas”

SABRINA DE ALMEIDA MARQUES

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.

Aprovado(a) por:

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

Prof. Dr. ETELVINO JOSÉ HENRIQUES BECHARA
IQ – USP

Prof. Dr. FERNANDO SALVADOR MORENO
FCF – USP

Prof. Dr. LUIS EDUARDO SOARES NETTO
IB – USP

Profa. Dra. ANA LÚCIA TABET OLLER DO NASCIMENTO
Instituto Butantan

SÃO PAULO
11 DE MAIO 2005

“ No silêncio das madrugadas, em que minha insônia ataca sem dar trégua, reflito sobre os acontecimentos do dia, lembro de meus amores, lamento as guerras, imagino a paz, e, de tanto desejá-la, vou fundo em minha imaginação. Penso como seria o mundo com ela, e, sem ao menos perceber, estou dormindo.”

Laion Castro

*A Vanessa e Andressa,
por existirem em minha vida e
despertarem o que há de melhor em mim.*

- AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profa. Dra. Marisa H. G. Medeiros, pela excelente orientação, pelo exemplo, pela confiança, amizade e por todas as oportunidades que me foram concedidas.

Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio, pela colaboração e pronta disposição em ajudar.

A Profa. Dra. Ana Paula M. Loureiro, pela colaboração nos experimentos, pela paciência, boa vontade e principalmente pela amizade durante estes anos.

A Profa. Dra. Gláucia R. Martinez, pelo companheirismo, boa vontade e principalmente por me ouvir todas as vezes que eu precisava conversar.

Ao Osmar F. Gomes, pela ajuda com os experimentos; realmente um amigo de todas as horas.

A Camila, pela ajuda nos experimentos, pela alegria contagiante e pela amizade e apoio de sempre.

Ao Prof. Dr. Humberto Reis Matos pela colaboração e por me ensinar as técnicas de trabalho com modelos animais.

Ao Edson Gomes, pela ajuda com os animais.

Aos amigos do laboratório: Alexandre, Lívea, Cláudia, Bianca, Ana Carolina, Flávio, Patrícia, Lydia, Clécio, Fernanda, Janice, Sayuri, Eduardo, Priscila, Christiane, Rodolfo, Miriam, Daniela e Tedra pela sincera amizade durante todos estes anos.

Aos Professores do Instituto de Química, por todo o apoio e aprendizado.

Ao Prof. Dr. Helmutt Sies, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo na Heinrich Heine Universität em Düsseldorf, Alemanha.

Ao Prof. Dr. Willheim Stahl, por me orientar durante o estágio em Düsseldorf, discutindo os resultados e expondo novas idéias.

Ao grupo do Prof. Stahl: Felicitas, Alejandro, Olivier, Juan, Dr. Antonio Perez, Dra. Christina Polidori, Peter e Heide, pela ajuda e por tornarem tudo mais fácil e agradável. Agradeço principalmente a Nilo, pelo auxílio nos experimentos e pela amizade.

A Frau Ursula Niehenke e aos amigos Didier e Tina, por terem me acolhido em Düsseldorf, fazendo com que eu me sentisse realmente em casa.

Aos meus pais, Márcio e Aparecida, pela minha criação, pelo incentivo, compreensão e amor, fazendo o possível para que nada me faltasse.

Ao meu marido Luciano, pela paciência, torcida e principalmente pela ajuda durante todos estes anos.

A minha querida tia Cláudia, por estar presente em todos os momentos e pelo carinho durante toda a minha vida.

Aos meus avós Paulo e Alice e à minha tia Maria, pelas preces, pelo incentivo e amor.

As minhas irmãs Beatriz e Eliana, por acreditarem sempre em mim e por serem minhas companheiras. Ao Roberto e ao Pedro, por fazerem as duas mais felizes.

A Dra. Andréa Antunes Pereira, pela amizade, colaboração e por estar sempre disposta a ajudar; ao seu marido, Eduardo, pelo apoio.

À Érica e Fabiana, minhas grandes amigas juníaienses.

Aos amigos da UNICAMP, Jorge, Danieli, Heloísa, Matheus, Ana Paula, Sandro e Daniele, por todos os anos de convívio e pela presença sempre constante em minha vida.

Ao Dr. Francisco dos Santos e a Márcia, por fazerem com que minha vida voltasse ao normal e por me despertarem para uma pessoa melhor.

A todos do Instituto de Química da USP, principalmente ao Jailton, Francisco, ao Emiliano e demais funcionários da Secretaria de Pós Graduação e aos funcionários do biotério por estarem sempre prontos a atenderem minhas necessidades.

Aos amigos do Cursinho, pela oportunidade, e carinho durante todo o ano.

Aos amigos da EMS Sigma Pharma, Rodrigo, Flávia, Elaine, Ricardo, Marcela, Regina, Marcos e Fábio; pelo apoio e torcida, apesar do pouco tempo de convivência.

Aos meus queridos bichinhos: Pituca, *Chilin*, Mimi, Julie e agora Nine, por fazerem minha vida mais alegre.

A **Deus**, por ter me dado a vida, e por sempre ter feito com que tudo fosse possível.

- APOIO FINANCEIRO

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

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

PRONEX/FINEP – Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência

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

INDICE DE FIGURAS, TABELAS E ESQUEMAS.....	i
ABREVIACÕES.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Radicais Livres e Estresse Oxidativo.....	1
1.1.1 O que são radicais livres e como reagem.....	1
1.1.2 Espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo.....	4
1.2 Lesões em DNA.....	4
1.2.1 Oxidação do DNA.....	6
1.2.1.1 Oxidação do DNA: Reparo.....	11
1.2.2 Adutos de DNA (Propano adutos e adutos de malonaldeído).....	12
1.2.3 Eteno adutos.....	13
1.2.3.1 Eteno Adutos: Reparo.....	17
1.2.3.2 Eteno Adutos: Níveis e métodos de detecção.....	18
1.3 Carotenóides.....	21
1.3.1 Química dos carotenóides e suas funções.....	21
1.3.2 Carotenóides: absorção e efeitos na saúde humana.....	26
1.3.3 Atividade pró – vitamina A dos carotenóides.....	28
1.3.4 Carotenóide e junções comunicantes intercelulares (Gap Junctional Communication).....	31
1.3.5 Ação antioxidante dos carotenóides.....	34
1.3.5.1 Fotoproteção.....	38
1.3.5.2 Reações com radicais de oxigênio.....	38
1.3.6 Ação pró oxidante dos carotenóides.....	40
1.3.7 Possíveis mecanismos pró e antioxidante do β -caroteno.....	42
1.3.8 Estudos epidemiológicos com β -Caroteno.....	44
1.3.9 β -Caroteno e seus metabólitos.....	48
1.3.10 β -caroteno: possíveis explicações para seu mecanismo de ação pró-oxidante.....	51
1.4 Breves considerações sobre Fumaça de Cigarro.....	52
2 OBJETIVOS.....	54

3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1	Reagentes.....	55
3.2	Equipamentos.....	55
3.2.1	Espectrômetro de massa (MS).....	56
3.2.2	Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC).....	56
3.2.3	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	59
3.2.4	Equipamento utilizado na análise da comunicação celular após o tratamento com β -caroteno e zeaxantina oxidados.....	59
3.3	Verificação da formação de produtos da reação entre 2'-desoxiguanosina (dGuo) e retinal.....	59
3.3.1	Reação entre dGuo e retinal na presença de peróxido de hidrogênio.....	59
3.3.2	Obtenção dos espectros de massa (LC/ESI/MS) dos produtos da reação entre retinal e dGuo.....	60
3.4	Desenvolvimento, padronização e validação de metodologia para a detecção sensível do 1,N ² - ϵ dGuo LC/ESI/MS-MS em sistemas biológicos... ..	61
3.4.1	Organização do sistema.....	61
3.4.2	Condições cromatográficas (HPLC) e condições de detecção no espectrômetro de massa do 1,N ² - ϵ dGuo nos sistemas modelo e em amostras biológicas.....	62
3.4.3	Aquisição dos espectros de massa do 1,N ² - ϵ dGuo e [¹⁵ N ₅]-1,N ² - ϵ dGuo por LC/ESI/MS-MS.....	63
3.4.4	Validação da metodologia da detecção do 1,N ² -eteno-2'-desoxiguanosina (1, N ² - ϵ dGuo) por LC/ESI/MS-MS.....	63
3.4.4.1	Curva de calibração para a quantificação do 1,N ² - ϵ dGuo por LC/ESI/MS-MS.....	63
3.4.4.2	Quantificação do 1, N ² - ϵ dGuo por LC/ESI/MS-MS em DNA de timo de bezerro comercial sem incubação.....	64
3.4.4.3	Quantificação do 1, N ² - ϵ dGuo por LC/ESI/MS-MS em DNA de fígado de ratas não tratadas.....	64
3.4.4.4	Quantificação do 1, N ² - ϵ dGuo por LC/ESI/MS-MS em DNA de cultura celular sem tratamento.....	64
3.5	Análise da lesão 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) nos sistemas modelos e nas amostras biológicas.....	65

3.6	Extração de DNA de amostras biológicas.....	65
3.7	Precipitação de DNA de timo de bezerro.....	66
3.8	Hidrólise do DNA de timo de bezerro e de amostras biológicas.....	66
3.9	Lesões em 2'-desoxiguanosina (dGuo) e DNA de timo de bezerro induzidas por β -caroteno e seus produtos de oxidação, retinal e β -apo-8'-carotenal.....	67
3.9.1	Incubações de dGuo com carotenóides.....	67
3.9.2	Incubações de DNA de timo de bezerro com carotenóides.....	67
3.10	Lesões em DNA de cultura celular tratada com β -caroteno e seus produtos de oxidação.....	67
3.10.1	Cultivo das células.....	67
3.10.2	Repique das células.....	68
3.10.3	Viabilidade celular da linhagem IMR 90 frente ao β -caroteno e seus produtos de oxidação.....	68
3.10.4	Tratamento das células IMR 90 com β -caroteno e seus produtos de oxidação.....	69
3.11	Biodisponibilidade do licopeno e do β -caroteno.....	69
3.11.1	Administração dos carotenóides.....	69
3.11.2	Coleta de sangue dos animais.....	70
3.11.2.1	Método 1 (Canulação dos animais).....	70
3.11.2.2	Método 2.....	70
3.11.3	Preparo e análise das amostras de sangue.....	70
3.12	Lesões em DNA de animais tratados com fumaça de cigarro e suplementados com β -caroteno.....	71
3.12.1	Tratamento por 7 e 30 dias.....	71
3.12.2	Tratamento por 180 dias.....	72
3.13	Ensaio de comunicação intercelular via junções comunicantes em células tratadas com β -caroteno e zeaxantina oxidados.....	73
3.13.1	Oxidação do β -caroteno e da zeaxantina.....	73
3.13.2	Cultivo das células WB-F344.....	73
3.13.3	Tratamento das células WB-344 com produtos de oxidação do β -caroteno e da zeaxantina e medida do número de células comunicantes.....	73
3.14	Análise estatística dos dados.....	74

4	RESULTADOS.....	75
4.1	Detecção e análise dos produtos formados na reação entre 2'-desoxiguanosina (dGuo) e retinal.....	75
4.1.1	Caracterização química e espectroscópica do produto 1.....	81
4.2	Validação da metodologia da detecção do 1,N ² -εdGuo por LC/ESI/MSMS..	85
4.2.1	Desenvolvimento, padronização e validação de metodologia para a detecção sensível do 1, N ² -εdGuo por LC/ESI/MS-MS em sistemas biológicos.....	85
4.3	Quantificação das lesões em DNA induzidas por carotenóides.....	93
4.3.1	Lesões em 2'-desoxiguanosina (dGuo) <i>in vitro</i> promovidas por carotenóides.....	93
4.3.1.1	Detecção e quantificação da lesão 1,N ² -εdGuo em incubações entre dGuo e carotenóides.....	93
4.3.1.2	Detecção e quantificação de 8-oxodGuo em incubações entre carotenóides e dGuo.....	96
4.3.2	Quantificação das lesões em DNA de timo de bezerro promovidas por carotenóides.....	100
4.3.2.1	Quantificação de 1,N ² -εdGuo em incubações entre DNA de timo de bezerro e carotenóides.....	100
4.3.2.2	Quantificação de 8-oxodGuo em incubações entre DNA de timo de bezerro e carotenóides.....	105
4.3.3	Lesões em sistemas celulares induzidas por carotenóides.....	109
4.3.3.1	Viabilidade das células de pulmão humano frente ao β-caroteno e seus produtos de oxidação.....	109
4.3.3.2	Detecção e quantificação de 1,N ² -εdGuo em células de pulmão humano tratadas com β-caroteno e seus produtos de oxidação.....	112
4.3.3.3	Detecção e quantificação da 8-oxodGuo em células de pulmão humano tratadas com β-caroteno e seus produtos de oxidação.....	114
4.4	Biodisponibilidade do β-caroteno e do licopeno.....	117

4.5	Lesões em DNA <i>in vivo</i>	119
4.5.1	Deteção e quantificação de 1,N ² - ϵ dGuo em DNA de pulmão de animais suplementados com β -caroteno e expostos à fumaça de cigarro.....	119
4.5.2	Deteção e quantificação de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de animais suplementados com β -caroteno e expostos à fumaça de cigarro.....	123
4.6	Experimentos para verificação da comunicação intercelular via junções comunicantes (Gap junctional communication) induzida por produtos de oxidação do β -caroteno e da zeaxantina.....	128
5	DISCUSSÃO.....	135
5.1	Formação de produtos da reação entre 2'-desoxiguanosina (dGuo) e retinal.....	135
5.2	Validação da metodologia da deteção do 1, N ² - ϵ dGuo por LC/ESI/MS-MS	136
5.3	Quantificação de lesões em dGuo/DNA induzidas por carotenóides.....	138
5.4	Lesões em DNA de células pulmonares em cultura induzidas por carotenóides.....	145
5.5	Biodisponibilidade do β -caroteno e do licopeno.....	148
5.6	Lesões em DNA de pulmões de ratos suplementados com β -caroteno e expostos à fumaça de cigarro.....	150
5.7	Comunicação intercelular via junções comunicantes induzida por produtos de oxidação do β -caroteno e da zeaxantina.....	157
6	CONCLUSÕES.....	160
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	163
8	CURRICULUM VITAE	191

- Índice de Figuras, Tabelas e Esquemas

Esquema 1.1: Exemplo de reações radicalares (Augusto e col., 1995).....	2
Esquema 1.2: Produtos predominantes da oxidação da 8-oxodGuo por $^1\text{O}_2$	10
Esquema 1.3: Mecanismo proposto para a formação de adutos a partir do 2,4-decadienal (Loureiro e col., 2000).....	15
Esquema 1.4: Sequência biossintética dos carotenóides nas plantas.....	24
Esquema 1.5: Mecanismo de clivagem do β -caroteno em animais (Lintig & Wyss, 2001).....	30
Esquema 1.6: Propriedades dos carotenóides.....	40
Esquema 1.7: Mecanismo proposto para a atividade de carotenóides frente à tensão de oxigênio.....	43
Esquema 1.8: Possível mecanismo da ação pró-carcinogênica do β -caroteno.....	51
Esquema 3.1: Esquema da válvula direcionadora de fluxos em suas duas posições.....	62
Esquema 3.2: Ilustração da exposição dos animais à fumaça de cigarro.....	72
Esquema 4.1: Estrutura do 1, N^2 - ϵ dGuo e o tautomerismo presente na molécula.....	84
Esquema 4.2: Mecanismo de formação da 8-oxodGuo por ação do radical hidroxila.....	97
Esquema 5.1: Mecanismo proposto para a formação do 1, N^2 - ϵ dGuo a partir do β -caroteno.....	141
Esquema 5.2: Possível mecanismo pelo qual a alta concentração do β -caroteno pode levar ao risco de câncer de pulmão em fumantes (Palozza, 1998).....	155
Esquema 6.1: Possíveis consequências da formação de adutos de DNA frente a exposição de β -caroteno.....	162
Figura 1.1: Algumas das bases oxidadas encontradas no DNA.....	8
Figura 1.2: Adutos formados a partir do malonaldeído e de hidroxialcenais.....	13
Figura 1.3: Estrutura dos eteno adutos mais estudados: 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina (1, N^2 - ϵ dGuo), N^2 ,3-eteno-2'-desoxiguanosina (N^2 ,3- ϵ dGuo), 1, N^6 -	

eteno-2'-desoxiadenosina (ϵ dAdo), 3, N^4 -eteno-2'-desoxicitosina (ϵ dCyd).....	16
Figura 1.4: Estrutura de alguns carotenóides encontrados em plantas e animais.....	22
Figura 1.5: Junções comunicantes são canais intercelulares agrupados próximos às membranas plasmáticas de duas células (Simon & Goodenough, 1998).....	32
Figura 1.6: Evidência cumulativa de câncer no pulmão entre participantes que receberam β -caroteno e placebo (sem β -caroteno).....	47
Figura 4.1: Cromatograma obtido por HPLC da incubação entre retinal, dGuo e H_2O_2 (50 mM). Detecção por UV a 254 nm.....	76
Figura 4.2: Cromatograma obtido por HPLC da purificação dos produtos B1 e B2. Detecção por UV a 254 nm.....	76
Figura 4.3: Espectros de ultravioleta dos produtos B1 e B2.....	77
Figura 4.4: Espectro de massa do produto B1 em diferentes voltagens do cone. ...	78
Figura 4.5: Espectro de massa do produto B2 em diferentes voltagens do cone.....	79
Figura 4.6: Cromatograma obtido por HPLC na purificação do produto A (Detecção por UV a 254 nm).....	80
Figura 4.7: Espectro de massa do produto 2.....	80
Figura 4.8: Espectro de massa do produto 1: 1, N^2 - ϵ dGuo.....	82
Figura 4.9: Espectro de ultravioleta do produto 1: 1, N^2 - ϵ dGuo.....	82
Figura 4.10: Padrão de eluição de uma mistura normal de nucleosídeos através de uma coluna analítica utilizando-se o sistema <i>on line</i> LC/ESI/MS-MS.....	86
Figura 4.11: Espectro de massa do 1, N^2 - ϵ dGuo.....	87
Figura 4.12: Espectro de massa do [$^{15}N_5$]-1, N^2 - ϵ dGuo.....	87
Figura 4.13: Detecção de 20 fmol do padrão, 1, N^2 - ϵ dGuo por análise de LC/ESI/MS-MS no modo MRM.....	88
Figura 4.14: Curva de calibração do 1, N^2 - ϵ dGuo.....	89
Figura 4.15: Exemplo de detecção de 1, N^2 - ϵ dGuo em amostra de DNA de fígado de rata não tratada pelo método de LC/ESI/MS-MS e função MRM.....	91

Figura 4.16: Níveis de 1,N ² -εdGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH 9,4.	94
Figura 4.17: Níveis de 1,N ² -εdGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH 7,4.	95
Figura 4.18: Perfil cromatográfico da análise de 8-oxodGuo.	97
Figura 4.19: Níveis de 8-oxodGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH 9,4.	98
Figura 4.20: Níveis de 8-oxodGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH 7,4.	99
Figura 4.21: Detecção do 1,N ² -εdGuo em DNA de timo de bezerro.	101
Figura 4.22: Níveis de 1,N ² -εdGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 9,4.	102
Figura 4.23: Níveis de 1,N ² -εdGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 7,4.	103
Figura 4.24: Níveis de 1,N ² -εdGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 7,4 com 0,1mM de desferroxamina.	104
Figura 4.25: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 9,4.	106
Figura 4.26: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 7,4.	107
Figura 4.27: Medida de sobrevivência relativa de células IMR 90 incubadas com retinal em diferentes concentrações por 17 h.	110
Figura 4.28: Medida de sobrevivência relativa de células IMR 90 incubadas com β-apo-8'-carotenal em diferentes concentrações por 17 h.	110
Figura 4.29: Medida de sobrevivência relativa de células IMR 90 incubadas com β-caroteno em diferentes concentrações por 17 h.	111
Figura 4.30: Níveis de 1,N ² -εdGuo em DNA de células de pulmão humano, IMR 90, com β-caroteno e seus produtos de oxidação (20 μM) por 17 h.	113
Figura 4.31: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de células de pulmão humano, IMR 90, com β-caroteno e seus produtos de oxidação (20 μM) por 17h.	115
Figura 4.32: Cromatogramas obtidos por HPLC (Materiais e métodos item 3.2.2; sistema6) a partir do plasma sanguíneo de ratos suplementados.	118
Figura 4.33: Biodisponibilidade do β-caroteno e do licopeno no plasma sanguíneo de animais tratados com 10 mg destes carotenóides.	119

Figura 4.34: Níveis de 1,N ² -εdGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β-caroteno e fumaça de cigarro por 7 dias.....	120
Figura 4.35: Níveis de 1,N ² -εdGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β-caroteno e fumaça de cigarro por 30 dias.....	121
Figura 4.36: Níveis de 1,N ² -εdGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β-caroteno e fumaça de cigarro por 180 dias.....	122
Figura 4.37: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β-caroteno e fumaça de cigarro por 7 dias.	124
Figura 4.38: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β-caroteno e fumaça de cigarro por 30 dias.....	125
Figura 4.39: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β-caroteno e fumaça de cigarro por 180 dias.....	126
Figura 4.40: Efeito dos metabólitos de carotenóides nas junções comunicantes intercelulares após tratamento de 24 h.....	129
Figura 4.41: Efeitos dos metabólitos dos carotenóides nas junções comunicantes intercelulares após tratamento de 72 h.....	129
Figura 4.42: Comparação dos efeitos do β-caroteno, zeaxantina e seus metabólitos nas junções comunicantes intercelulares após tratamento de 24 h....	131
Figura 4.43: Comparação dos efeitos do β-caroteno, zeaxantina e seus metabólitos nas junções comunicantes intercelulares após tratamento de 72 h.	131
Figura 4.44: Ensaio para verificação da comunicação intercelular via junções comunicantes, utilizando o corante fluorescente (Lucifer yellow).....	133
Figura 4.45: Ensaio para verificação da comunicação intercelular via junções comunicantes, utilizando o corante fluorescente (Lucifer yellow).....	134
Tabela 1.1: Espécies reativas de oxigênio.....	3
Tabela 4.1: Deslocamentos químicos no espectro de ¹ H RMN do aduto 1,N ² -εdGuo.....	83
Tabela. 4.2: Níveis basais de 1,N ² -εdGuo obtidas pela metodologia de LC/ESI/MS-MS.....	92
Tabela 4.3: Níveis de 1,N ² -εdGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH 9,4.....	94

Tabela 4.4: Níveis de 1,N ² -εdGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH 7,4.....	95
Tabela 4.5: Níveis de 8-oxodGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH 9,4....	98
Tabela 4.6: Níveis de 8-oxodGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH 7,4....	99
Tabela 4.7: Níveis de 1,N ² -εdGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 9,4.....	102
Tabela 4.8: Níveis de 1,N ² -εdGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 7,4.....	103
Tabela 4.9: Níveis de 1,N ² -εdGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 7,4 e adição de solução de desferroxamina (0,1 mM).....	104
Tabela 4.10: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 9,4.....	106
Tabela 4.11: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 7,4.....	107
Tabela 4.12: Níveis de 1,N ² -εdGuo em DNA de células de pulmão humano (IMR90) tratadas com β-caroteno e seus produtos de oxidação (20 μM) por 17 h.....	113
Tabela 4.13: Níveis de 1,N ² -εdGuo em DNA de células de pulmão humano (IMR90) tratadas com β-caroteno e seus produtos de oxidação (20 μM) por 17 h.....	115
Tabela 4.14: Níveis de 1,N ² -εdGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β-caroteno e fumaça de cigarro por 7 dias.....	120
Tabela 4.15: Níveis de 1,N ² -εdGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β-caroteno e fumaça de cigarro por 30 dias.....	121
Tabela 4.16: Níveis de 1,N ² -εdGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β-caroteno e fumaça de cigarro por 180 dias.....	122
Tabela 4.17- Níveis de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β-caroteno e fumaça de cigarro por 7 dias.....	124
Tabela 4.18- Níveis de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β-caroteno e fumaça de cigarro por 30 dias.	125
Tabela 4.19- Níveis de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β-caroteno e fumaça de cigarro por 180 dias.....	126

- ABREVIÇÕES

1, N^2 - ϵ dGuo	1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina
N^2 , 3- ϵ dGuo	N^2 , 3-eteno-2'-desoxiguanosina
8-oxodAdo	8-oxo-7, 8-dihidro-2'-desoxiadenosina
8-oxodGuo	8-oxo-7, 8-dihidro-2'-desoxiguanosina
A	Adenina
Ac	Acetato
AcOEt	Acetato de etila
Ac. Ret.	Ácido Retinóico
ACN	Acetonitrila
AIBN	2, 2'- azobisisobutironitrila
AMVN	2,2-azo-bis-2,4-dimetilvaleronitrila
ANPG	alquil- <i>N</i> -purina-glicosilase
AP	Apurínicos/apirimidínicos, abásicos
ATBC	The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study
β -apo	β -apo-8'-carotenal
β -car	β -caroteno
BER	Reparo por excisão de base
cAMP	AMP cíclico
C	Citosina
CARET	The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial
col.	Colaboradores
Da	Daltons
DDE	<i>trans, trans</i> -2,4-Decadienal
dAdo	2'-desoxiadenosina
dCyd	2'-desoxicitidina
dGuo	2'-desoxiguanosina
dGh	Guanidinohidantoína 2'-desoxirribonucleosídeo
dlz	2-amino-5-[(2'-desoxi- β -D- <i>erythro</i> -pentofuranosil)amino]-4H-imidazol-4-ona
dOz	2,2-diamino-4-[2'-desoxi- β -D- <i>erythro</i> -pentofuranosil)amino]5-(2H)-oxazolona
dOxa	Ácido oxalúrico 2'-desoxirribonucleosídeo
dR	Desoxirribose
dSp	Nucleosídeo da espiroiminodihidantoína
dThd	2'-desóxitimidina
DMBA	7, 12-dimetilbenzoantraceno
DME	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO- d_6	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ϵ dAdo	1, N^6 -eteno-2'-desoxiadenosina
ϵ dCyd	3, N^4 -eteno-2'-desoxicitosina
ϵ dGuo	eteno-2'-desoxiguanosina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Eletroquímico
EDTA	Ácido etilenediaminotetraacético
ESI	Ionização por eletrospray
Endo III	Endonuclease III
EtOH	Etanol
G	Guanina
FPG	Formamidopirimidina DNA <i>N</i> -glicosilase
GJC	Comunicação intercelular via junções comunicantes
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HHE	4-hidróxi-2-hexenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
<i>i.p.</i>	intra peritonal

IU	Unidade internacional
LC	Cromatografia Líquida
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malonaldeído
MeOH	Metanol
MMR	Reparo por pareamento errado de bases
MRM	Monitoramento de reação múltipla
MS	Espectroscopia de massas
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium
m/z	razão massa / carga
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NER	Reparo por excisão de nucleotídeo
Ox. β -car	β -caroteno oxidado
Ox. zea	zeaxantina oxidada
pH	Potencial hidrogeniônico
PAH	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
PBS	Tampão fosfato salino
PPL	Postlabeling
PVC	Poli (cloreto de vinila)
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
RNase	Ribonuclease
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
T	Timina
TBARS	ácido-tiobarbitúrico
THF	Tetrahidrofurano
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade
UV	Ultravioleta
Zea	Zeaxantina

- RESUMO

Apesar de diversos estudos *in vitro* e em populações indicarem um efeito protetor do β -caroteno em sistemas biológicos, estudos epidemiológicos como o "The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study" (ATBC) e o "The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial" (CARET) mostraram um aumento na incidência de câncer pulmonar em indivíduos fumantes suplementados com β -caroteno. Essa ação contraditória tem sido chamada na literatura de "Paradoxo do β -Caroteno". Sabe-se que este carotenóide sob altas pressões de oxigênio ou na presença de peróxidos pode sofrer oxidação e levar a formação de compostos como aldeídos, epóxidos, etc, que são capazes de se adicionarem covalentemente ao DNA. Estudos, *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a possibilidade de os metabólitos do β -caroteno agirem como agentes pró-carcinogênicos. Estes agentes quando ativados quimicamente podem levar à formação de adutos de DNA. Já se sabe que alguns desses adutos encontram-se em níveis aumentados em diversas situações de risco de câncer. Diversos grupos, incluindo o nosso, têm demonstrado a formação de lesões em DNA a partir de aldeídos e epóxidos exógenos ou gerados endogenamente.

O presente trabalho mostra que a reação do β -caroteno e dois de seus produtos de oxidação, retinal e β -apo-8'-carotenal, com 2'-desoxiguanosina e DNA leva à formação de adutos. Dentre os adutos formados, foi caracterizado o aduto 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina (1, N^2 - ϵ dGuo). Os níveis de outro aduto de DNA, a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodGuo), também foram monitoradas para estudo comparativo. A formação dos adutos também foi verificada em fibroblastos normais de pulmão humano (linhagem IMR-90) expostos ao β -caroteno e aos seus produtos de oxidação.

Experimentos com ratos suplementados com β -caroteno e expostos à fumaça de cigarro em períodos de 7, 30 e 180 dias, mostraram níveis aumentados de 1, N^2 - ϵ dGuo nos animais suplementados com o carotenóide comparado ao grupo veículo. Aumento no nível de 8-oxodGuo também foi verificado nos tratamentos de 7 e 180 dias. Um aumento significativo no nível do eteno aduto também foi verificado nos animais suplementados com β -caroteno e expostos à fumaça de cigarro, comparado

ao grupo apenas exposto à fumaça após 7 e 180 dias de exposição. Nestes mesmos grupos, o aumento do 8-oxodGuo só foi observado no tratamento por 180 dias.

Sabendo que estas lesões são comprovadamente mutagênicas, nossos estudos podem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na formação de câncer em fumantes suplementados ou não com β -caroteno.

- ABSTRACT

Despite several studies performed *in vitro* and in population indicate a protector effect of β -carotene, the epidemiological studies "The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study" (ATBC) and "The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial" (CARET) showed a relative risk for lung cancer in smokers supplemented with β -carotene. It is well known that this carotenoid is able to oxidize in high oxygen tension or in the presence of peroxides yielding to aldehydes, epoxides, and other compounds that are capable to bind to DNA. The possibility that β -carotene oxidation products can act as pro carcinogenic agents is under investigation. These products can be activated by peroxides, or by enzymes such as cytochrome P450, leading to DNA adducts formation. Several groups, like ours, showed the formation of DNA adducts from aldehydes or epoxides generated by endogenous or exogenous sources.

We investigated here the reactions of β -carotene, and two of its oxidation products, retinal and β -apo-8'-carotenal, with 2'-deoxyguanosine to evaluate their DNA damaging potential. A known mutagenic adduct, 1, N^2 -etheno-2'-deoxyguanosine (1, N^2 - ϵ dGuo) was isolated and characterized on the basis of its spectroscopic features. After treatment of calf thymus DNA with β -carotene or β -carotene oxidation products, significantly increased levels of the etheno adduct were detected and quantified in DNA by a sensitive LC/ESI/MS-MS technique. For comparative purposes, levels of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine were also evaluated (8-oxodGuo). Levels of these lesions were also increased. Exposure of human lung cells (IMR 90) to the carotenoids also leads to increased levels of the two adducts.

As the main noteworthy result, rats supplemented with β -carotene for 7, 30, and 180 days showed significantly higher lung DNA concentrations of the 1, N^2 - ϵ dGuo adduct than those of the control group. The level of 8-oxodGuo was also increased after 7 and 180 days in the group supplemented with the carotenoid. Rats supplemented with β -carotene and exposed to cigarette smoke for 7 and 180 days also showed significantly increased levels of the adduct 1, N^2 - ϵ dGuo when compared with

the group exposed to cigarette smoke. In the same groups level of 8-oxodGuo was only increased after 180 days of treatment.

These DNA lesions are confirmed mutagenic, so our data could contribute to the elucidation of the mechanisms responsible for the association between β -carotene and lung cancer in smokers.

Introdução

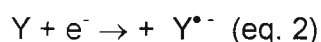
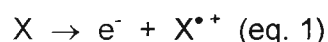
1 – INTRODUÇÃO

1.1- Radicais Livres e Estresse Oxidativo:

1.1.1 - O que são radicais livres e como reagem:

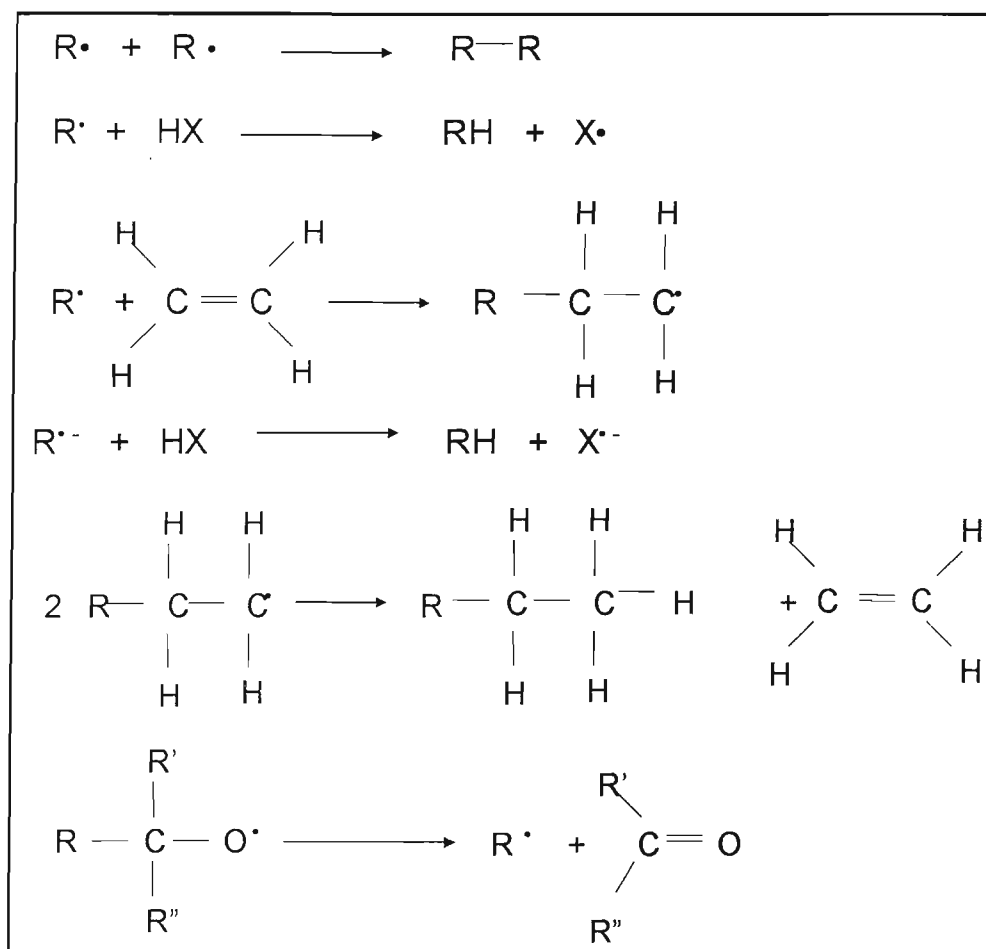
Radicalis livres são quaisquer espécies capazes de existirem independentemente e que contêm um ou mais elétrons desemparelhados. Um elétron desemparelhado é aquele que ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular. Há muitos radicalis livres, sendo que o mais simples deles é o hidrogênio, ^1H , que possui apenas um elétron que está desemparelhado.

Os radicalis livres podem ser formados pela perda ou ganho de um elétron de uma espécie não radicalar (eq. 1 e 2).



Os radicalis livres podem ainda ser formados quando uma ligação covalente é quebrada. Se cada um dos elétrons desta ligação ficar com um dos átomos que formavam a ligação, o processo é conhecido como fissão homolítica; se os dois elétrons da ligação ficarem com apenas um dos átomos da ligação covalente, ela é conhecida como fissão heterolítica (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Os principais tipos de reações entre radicalis livres são: dimerização, transferência de átomos (abstração de hidrogênio), adição, transferência de elétrons, dismutação e cisão β (Augusto e col., 1995). Estas reações estão ilustradas no esquema 1.1.



Esquema. 1.1: Exemplos de reações radiculares (Augusto e col., 1995).

Como mostram as reações, os radicais livres podem reagir entre si, compartilhando elétrons desemparelhados formando uma ligação covalente; ou ainda podem reagir com uma espécie não radicalar e iniciar uma cadeia reacional (Halliwell & Gutteridge, 1999). As reações de dimerização e de dismutação são processos terminais, já que os radicais são destruídos, ao passo que as outras reações são de processos de propagação, pois as espécies radiculares são conservadas (Augusto e col., 1995).

Os termos “espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio”, ROS ou RNS, são muito utilizados pelos cientistas e incluem não só os radicais de oxigênio e nitrogênio como também derivados fontes e derivados deles (Tabela 1.1.) (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Tabela 1.1: Espécies reativas de oxigênio

<i>Radicalares</i>	<i>Não radicalares</i>
Superóxido, $O_2^{\bullet -}$	Peróxido de Hidrogênio, H_2O_2
Hidroxila, HO^{\bullet}	Ác. Hipocloroso, $HOCl$
Peroxila, $RO_2^{\bullet -}$	Ozônio, O_3
Alcoxila, RO^{\bullet}	Oxigênio Singlete, 1O_2 ($^1\Delta g$)
Hidroperoxila, $HO_2^{\bullet -}$	Peroxinitrito, $ONOO^-$

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas em condições normais no organismo como por exemplo, no complexo xantina/ xantina oxidase, em células fagocíticas, pelo vazamento de elétrons da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e microsomal, resultando na formação do ânion radical superóxido, entre outras fontes. Assim, o metabolismo celular normal é uma fonte endógena de ROS, e são esses processos celulares (normalmente não patológicos) que contribuem para o nível basal das lesões em DNA detectadas em tecidos normais (Cooke e col., 2003). Estas espécies também podem ser formadas pela exposição a fatores exógenos como o tabaco, ozônio e poluentes ambientais assim como no metabolismo de algumas drogas. Níveis aumentados dessas espécies podem causar danos em DNA, em proteínas e em lipídios. Assim é necessário que se tenha um balanço entre as espécies oxidantes e a defesa antioxidante celular para evitar tais injúrias (Halliwell & Gutteridge, 1999; Bartsch & Nair, 2000; Cooke e col., 2003).

Certas atividades enzimáticas também podem gerar o ânion superóxido via o “burst respiratório”; como já mencionado, as espécies reativas de oxigênio podem ser liberadas das células fagocíticas destinadas a destruir células infectadas por vírus ou bactérias. As espécies reativas de oxigênio podem interagir com biomoléculas como DNA, proteínas, lipídios, membranas celulares, levando a modificações e sérias conseqüências às células (Cooke e col., 2003).

1.1.2 – Espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo

Em organismos aeróbicos saudáveis, a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio é aproximadamente balanceada pelas defesas do sistema antioxidante. Antioxidantes biológicos são compostos que protegem sistemas biológicos contra efeitos deletérios de processos ou reações que causam excessivas oxidações (Palozza, & Krinsky 1992). Se este balanço não é perfeito, ou seja, se a concentração ou reatividade de ROS/RNS estiver superior à de antioxidantes, podem ocorrer lesões e então é necessário que as moléculas lesadas sejam reparadas (ex: DNA) ou trocadas (ex: proteínas oxidadas) (Halliwell & Gutteridge, 1999; Gow & Ischiropoulos, 2001). Quando o balanço entre as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio não estão em equilíbrio com a defesa antioxidante, temos então o “estresse oxidativo”. Sies, em 1991 definiu estresse oxidativo como um distúrbio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante que pode levar a uma lesão em potencial, que por sua vez é chamada de “lesão oxidativa” (Sies, 1991; Halliwell & Gutteridge, 1999).

O estresse oxidativo pode ser causado por uma diminuição na concentração de antioxidantes. Como exemplos importantes de antioxidantes tem-se o licopeno e o β -caroteno, além de enzimas como superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Os radicais de oxigênio gerados durante a redução do oxigênio molecular podem reagir com as bases de DNA ou resíduos de desoxirribose produzindo bases oxidadas ou quebras na cadeia do DNA. Além disso, os oxi-radicais podem oxidar lipídios ou moléculas protéicas gerando intermediários que reagem com o DNA levando à formação de adutos. A replicação do DNA contendo estes danos pode levar a mutações (Marnett, 2000).

1.2 – Lesões em DNA

O DNA é susceptível a danos químicos à temperatura e pH fisiológicos, assim milhares de depurinações ocorrem em cada célula diariamente. Esta instabilidade é crucial para a evolução biológica, já que ela leva a um pequeno nível de mutações espontâneas no genoma. Isto é uma estratégia potencialmente

perigosa, já que há sempre o risco de que a maquinaria de reparo de DNA não seja totalmente eficiente e que os danos potencialmente deletérios não sejam reparados, levando a uma inaceitável alta taxa de mutações (Shuker, 2002).

As lesões em DNA são uma importante causa de doenças genéticas. Eventos químicos que levam a estes danos incluem hidrólise, oxidação e ataques eletrofílicos (alquilações) à cadeia do DNA (Martinez e col., 2003). Estas reações são iniciadas pela exposição das células a agentes químicos exógenos, como agentes do meio ambiente, constituintes dos alimentos, ou ainda podem resultar de processos metabólicos (Marnett & Plastaras, 2001).

A correspondência entre certos tipos de danos ao DNA e o sistema complementar de reparo levou à idéia de que a bioquímica celular normal leva a intermediários que atacam o DNA. Como exemplo, tem-se a respiração, que leva a formação de radicais hidroxila (HO^{\bullet}) que podem atacar o DNA em vários sítios levando a danos característicos como aqueles que formam a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo). Um mecanismo específico de reparo de DNA, formamidopirimidina glicosilase, existe para a remoção desta lesão (Boiteux & Laval, 1997; Shuker, 2002).

A integração entre a síntese química e a biologia molecular possibilita estratégias para a construção de modelos de DNA contendo lesões em pontos definidos para que assim se possa avaliar o potencial mutagênico e o reparo destas lesões (Marnett & Plastaras, 2001). Danos oxidativos em DNA podem ser gerados pela reação entre esta molécula e espécies reativas de oxigênio. Esses danos consistem em lesões nas bases, quebras na cadeia e ainda formação de produtos de alquilação nas bases (Moller & Wallin, 1998). Muitos compostos mutagênicos ambientais e carcinogênicos humanos reagem com o DNA produzindo adutos ou outras formas de danos genômicos. Quando não reparadas, essas lesões podem levar a erros na replicação, manifestadas por mutações que podem contribuir para um processo carcinogênico ou mesmo de envelhecimento e desenvolvimento de certas doenças crônicas (Ames & Gold, 1991). Os adutos, por exemplo, podem inibir a síntese de DNA, lisar eritrócitos ou mesmo modificar a atividade de proteínas (Esterbauer e col., 1991). No princípio acreditava-se que os agentes exógenos fossem a maior fonte de danos em DNA nos seres humanos, mas os avanços em técnicas de detecção ultra-

sensíveis revelaram a existência de diversos e abundantes tipos de danos resultantes de fontes endógenas (Marnett & Plataras, 2001). Dentre estes danos podemos citar os sítios apurínicos/apirimidínicos (sítios AP) que são produzidos por hidrólise espontânea, alquilações e oxidações de bases, entre outras. Embora quase sempre reparadas (Menisoglu & Samson, 2000), os sítios AP induzem substituições nos pares de bases e outros tipos de mutações já detectadas (Gentil e col., 1990; Lawrence e col., 1990, Jackson e col., 1998; Marnett & Plataras, 2001).

Dentre as espécies reativas de oxigênio uma das mais reativas é o radical hidroxila (HO^{\bullet}) (Cooke e col., 2003). Como já mencionado, o ataque de radicais de oxigênio ao DNA leva a cisões em sua cadeia e também a bases oxidadas (Marnett & Plataras, 2001; Cooke e col., 2003). Um dano frequente e pré-mutagênico causado por radicais hidroxila é a oxidação da base 2'-desoxiguanosina, a 8-oxodGuo, que leva à transversões $\text{G} \rightarrow \text{T}$ quando o aduto é replicado em plasmídeo em *E. coli* (Moller & Wallin, 1998; Klungland e col., 1999).

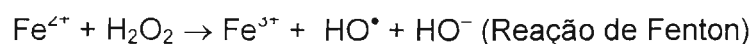
As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem levar ainda à oxidação de lipídios. Isto resulta na formação de produtos como o *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE), *trans*-4-hidroxi-2-hexenal (HHE), malonaldeído e crotonaldeído, que participam, por exemplo, da etiologia do câncer de colo retal (Bartsch e col., 1999). Esses intermediários podem reagir diretamente com bases do DNA para formar adutos exocíclicos, uma vez que as bases do DNA são susceptíveis a ataques de reagentes nucleofílicos (Koc & Swenberg, 2002). O padrão de danos induzidos em DNA por esses aldeídos é bem diversificado, uma vez que os adutos podem ser formados tanto através da reação direta dos aldeídos com as bases do DNA, como via seus derivados epoxidados (Chung e col., 1996).

1.2.1 – Oxidação do DNA

Modificações em DNA causadas pela exposição a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são eventos iniciais envolvidos na indução de efeitos mutagênicos e letais (Ravanat e col., 2000).

Há muitos agentes oxidantes responsáveis pela produção de lesões em DNA. Um dos efeitos da radiação por UVA é a foto-oxidação do DNA celular (Ravanat e col., 2000). O radical hidroxila (HO^{\bullet}) é extremamente reativo, sendo

capaz de oxidar bases de DNA, além de abstrair átomos de hidrogênio dos ácidos graxos insaturados formando produtos de lipoperoxidação. Provavelmente o radical HO[•] participa da oxidação endógena do DNA, entretanto não é o HO[•] livre gerado num compartimento celular que difunde para o núcleo. A reatividade do HO[•] é tão grande que ele não se difunde mais que um ou dois diâmetros moleculares antes de reagir com outro componente celular. Para que o HO[•] oxide o DNA, ele deve ser gerado imediatamente perto do ácido nucléico (formação sítio-específica). É provável então que o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) sirva como uma fonte difusível de HO[•], que seria gerado quando H₂O₂ se encontra na presença de metais como o ferro via reação de Fenton. Na presença de cobre, o mesmo poderia ocorrer (Marnett, 2000).



Outro oxidante importante é o peroxinitrito, que é estável em pH alcalino, mas quando protonado (pKa = 6,6) ele se decompõe gerando NO₃⁻, HO[•] e [•]NO₂, que é capaz de oxidar diversas biomoléculas (Augusto e col., 2002).

Baixos níveis de produtos de bases oxidadas estão presentes em DNA de tecidos normais (Cooke e col., 2003). Entretanto, esses níveis aumentam em condições inflamatórias (Wiseman & Halliwell, 1996) e também em indivíduos submetidos ao estresse oxidativo, como por exemplo, aquele induzido por fumaça de cigarro (Chen e col., 2004). Alguns destes produtos de bases lesadas são excretados pela urina, provavelmente devido aos processos de reparo do DNA (Chen e col., 2004).

A medida de danos por oxidação de bases em DNA celular continua recebendo atenção devido à necessidade de dados exatos do nível das bases oxidadas em DNA *in vivo*. Neste sentido, a otimização de métodos de extração de DNA e a disponibilização de métodos como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/ESI/MS-MS), constituem grandes progressos (Cadet e col., 2002). Entretanto, para a quantificação de baixos níveis de bases oxidadas, o ensaio por cometa, que envolve o uso de enzimas como a

formamidopiridina DNA *N*-glicosilase (FPG) e endonuclease III (endo III) para quebrar DNA oxidados em sítios modificados de purinas e pirimidinas respectivamente é mais apropriado (Collins & Horvathova, 2001).

Algumas das oxidações em bases do DNA estão mostradas na figura a seguir (Fig. 1.1).

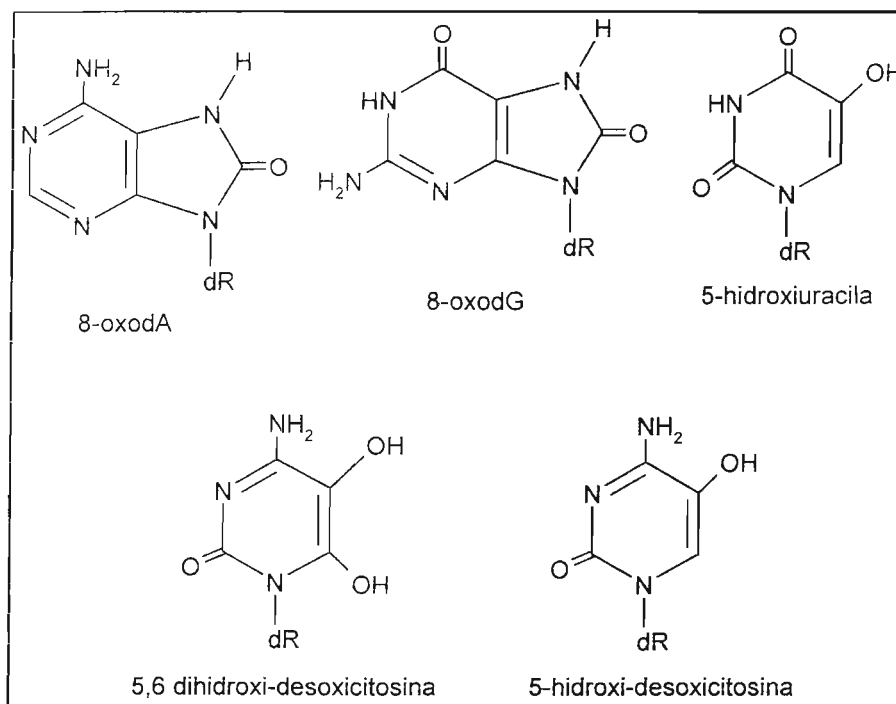
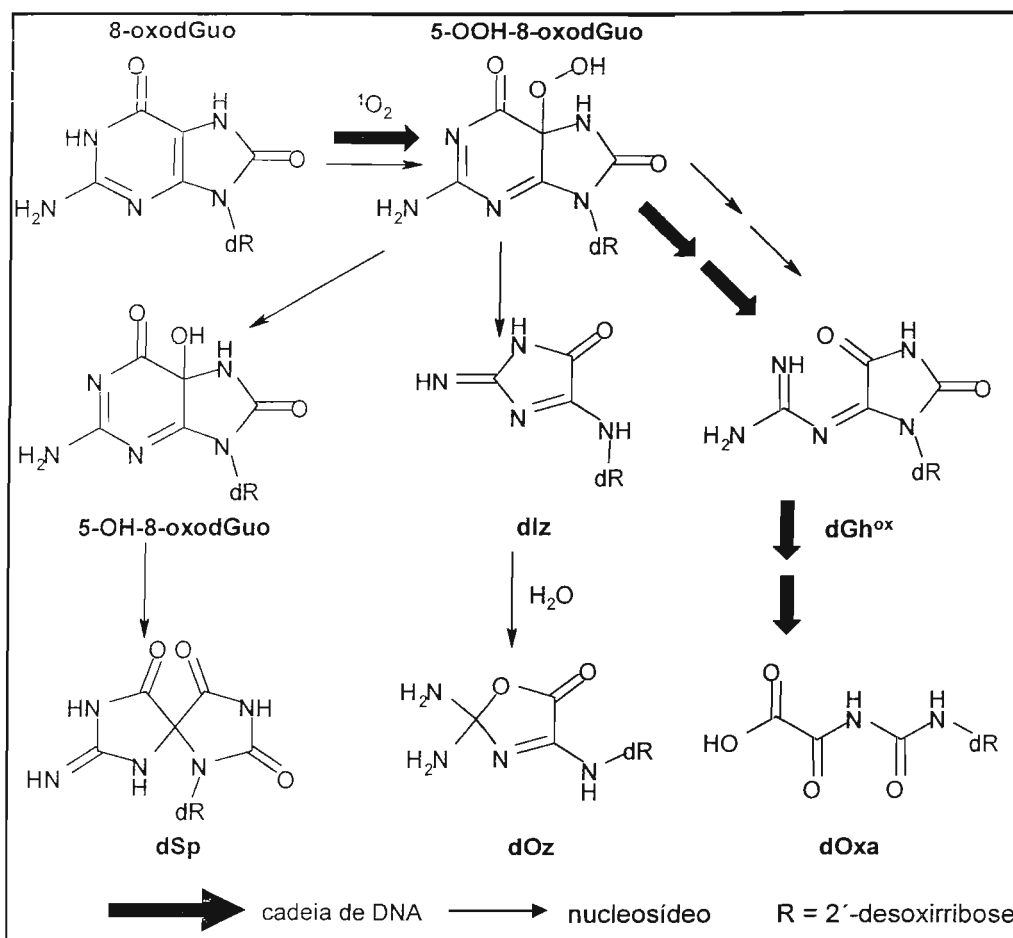


Fig. 1.1: Algumas das bases oxidadas encontradas no DNA.

Como já mencionado, um dano bastante comum causado pelo radical hidroxila, oxigênio singlete e radicais peroxila (ROO^{\bullet}) é a oxidação da guanina, a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) que leva a transições $G \rightarrow T$ (Moller & Wallin, 1998; Lim e col., 2004). Muitos estudos vêm sendo realizados na tentativa de se elucidar as reações de oxidação das bases purínicas. Vale ressaltar que a guanina, por possuir o menor potencial de ionização entre os componentes dos ácidos nucleicos, é o alvo preferencial da oxidação; entretanto todas as bases são passíveis de oxidação (Cadet e col, 2003). O produto de sua oxidação, a 8-oxodGuo possui um potencial de oxidação menor que o da guanina (Ravanat e col., 2003), sendo assim, a 8-oxodGuo torna-se um alvo favorável a

outros oxidantes (Burrows & Muller, 1998; Cadet e col., 2003; Misiaszek e col., 2004). Esta reatividade resulta em mais danos intramoleculares em DNA, mas também contribui para a proteção contra danos intermoleculares em DNA durante o processo de estresse oxidativo. Kim e col. (2004) sugerem que a 8-oxodGuo deve ser rapidamente removida do DNA para evitar lesões posteriores. Quando liberada no citossol, ela parece prover um efeito protetor agindo como seqüestradora. Sendo assim, a 8-oxodGuo pode ser chamada de “molécula suicida” já que é atacada preferencialmente pelo estresse oxidativo e se sacrifica para proteger outras moléculas (Kim e col., 2004).

A oxidação da 8-oxodGuo por oxigênio singlete está mostrada no esquema 1.2 (Martinez e col., 2003).



Esquema 1.2: Produtos predominantes da oxidação da 8-oxodGuo por $^1\text{O}_2$. A reação com o $^1\text{O}_2$ da origem ao 5-hidroperóxido (5-OOH-8-oxodGuo) que se decompõe em: dSp, dlz, dOz e dGh^{ox}. Em cadeia de DNA a dGh^{ox} dá origem ao dOxa.

Legenda: dSp: Nucleosídeo da espiroiminodihidantoína; dlz: 2-amino-5-[(2'-desoxi-β-D-erythro-pentofuranosil) amino]-4H-imidazol-4-ona; dOz: 2,2-diamino-4-[2'-desoxi-β-D-erythro-pentofuranosil) amino]-5-(2H)-oxazolona; dGh^{ox}: guanidinohidantoína 2'-desoxirribonucleosídeo oxidado; dOxa: ácido oxalúrico 2'-desoxirribonucleosídeo.

1.2.1.1 – Oxidação do DNA: Reparo

A existência de sistemas para remover bases oxidadas de DNA é uma forte evidência da ocorrência de danos em DNA espontâneos através das diferentes formas de vida. Os principais mecanismos celulares de reparo são: reparo por excisão de base (BER) que envolve a remoção de lesões pela ação de glicosilases; reparo por excisão de nucleotídeo (NER), um processo mais complexo que envolve a remoção de um oligonucleotídeo contendo a lesão; reparo por pareamento errado de bases (MMR), envolvido na correção de bases erradas durante a replicação. Existe também o reparo por recombinação, que consiste no reparo de quebras na cadeia dupla do DNA. A 8-oxodGuo é reparada principalmente por BER, ao passo que adutos de malonaldeído, propano adutos e adutos de PAH (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) estáveis são reparados por NER (Braithwaite e col., 1999). A identidade dos produtos formados nos processos é importante já que a detecção dos mesmos em fluidos extracelulares pode ajudar na descoberta dos mecanismos de reparo (Cooke e col., 2003).

As enzimas mais importantes envolvidas no reparo da 8-oxodGuo do DNA são a formamidopirimidina-DNA-glicosilase (FPG ou MutM) e MutY-glicosilase. A enzima FPG remove 8-oxodGuo quando pareada com a citosina (Boiteux e col., 1992); já a MutY-glicosilase remove a adenina quando pareada com a 8-oxodGuo (Michaels e col., 1992). Juntas, estas enzimas reduzem o potencial mutagênico destas espécies. Boiteux e col. (2002) verificaram que *S. cerevisiae* utiliza algumas estratégias para prevenir a indução de mutagenicidade causada pela 8-oxodGuo. O reparo por excisão de base (BER) é o maior contribuinte, sendo que o reparo por excisão de nucleotídeo (NER) é utilizado em segundo plano. O reparo por pareamento errado de bases (MMR) é utilizado quando as adenosinas são incorporadas pareando com a 8-oxodGuo. A polimerase η também participa, adicionando preferencialmente a citosina no pareamento com a lesão. A inativação do gene OGG1 em leveduras, levou a observação de um fenótipo mutante específico para a geração de transversões GC \rightarrow TA, relacionadas com a ocorrência de 8-oxodGuo (Boiteux e col., 2002). Estudos mais recentes mostram que a 8-oxodGuo, dGh e Sp também são

reparadas pelas glicosilases OGG1 e OGG2 de leveduras e também pela OGG1 humana (Leipold e col., 2003).

1.2.2 – Adutos de DNA (Propano adutos e adutos de malonaldeído)

Aldeídos α,β -insaturados, ou variantes estruturais dos mesmos (hidroxialcenais e epoxialdeídos), assim como malonaldeído são agentes alquilantes com capacidade de se ligarem covalentemente a grupos nucleofílicos presentes no DNA, em proteínas, e peptídeos, provocando alterações nas funções destas moléculas. Os produtos formados pela alquilação do DNA com estes compostos são chamados de adutos de DNA (revisado por Loureiro e col., 2002a).

O malonaldeído (MDA) é um dos produtos gerados na peroxidação lipídica. Muitos estudos relatam sua mutagenicidade em bactéria, em células de mamífero e sua carcinogenicidade em ratos. Além do malonaldeído, outros aldeídos gerados endogenamente podem contribuir para o conjunto de danos basais encontrados no DNA; dentre eles: os hidroxialcenais, *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e o *trans*-4-hidroxi-2-hexenal (HHE). A reatividade dos 4-hidroxialcenais é devida à presença de três grupos funcionais principais em suas estruturas: o grupo aldeído, a dupla ligação e o grupo hidroxila. A sua habilidade em reagir rapidamente com nucleófilos contribui para sua toxicidade. Os adutos formados pelos 4-hidroxialcenais são chamados de propano adutos, embora o malonaldeído também possa formar este tipo de aduto (revisado por Loureiro e col., 2002a). Os adutos formados a partir do malonaldeído e dos 4-hidroxialcenais estão mostrados na figura 1.2.

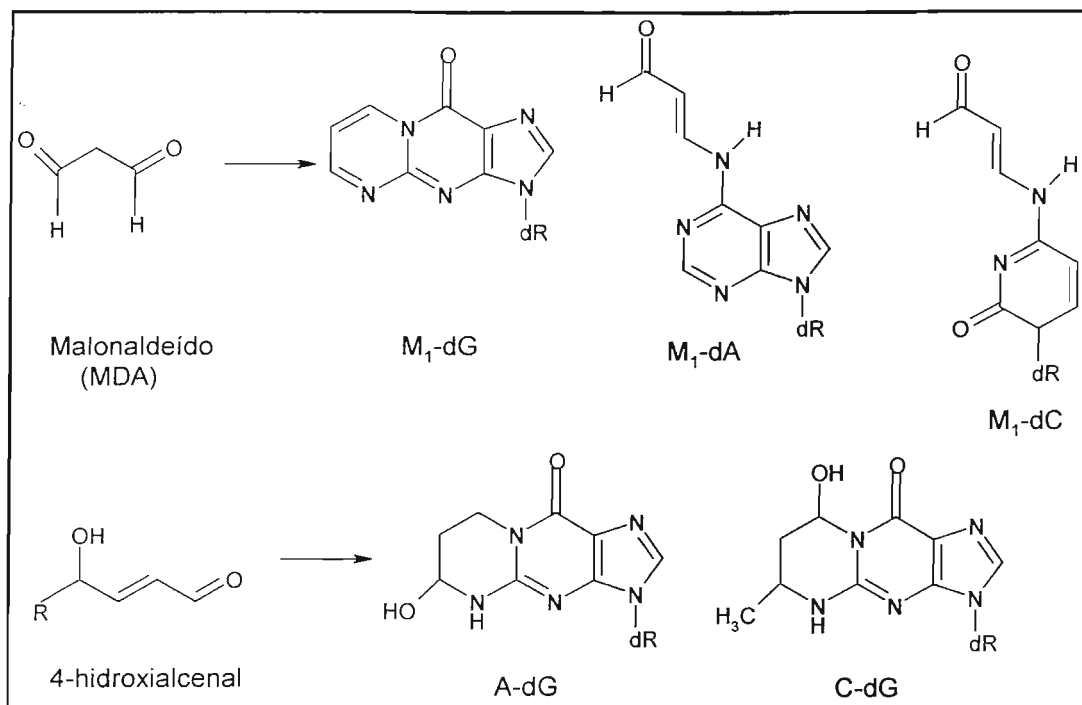


Fig. 1.2: Adutos formados a partir do malonaldeído e de hidroxialcenais.

1.2.3- Eteno adutos

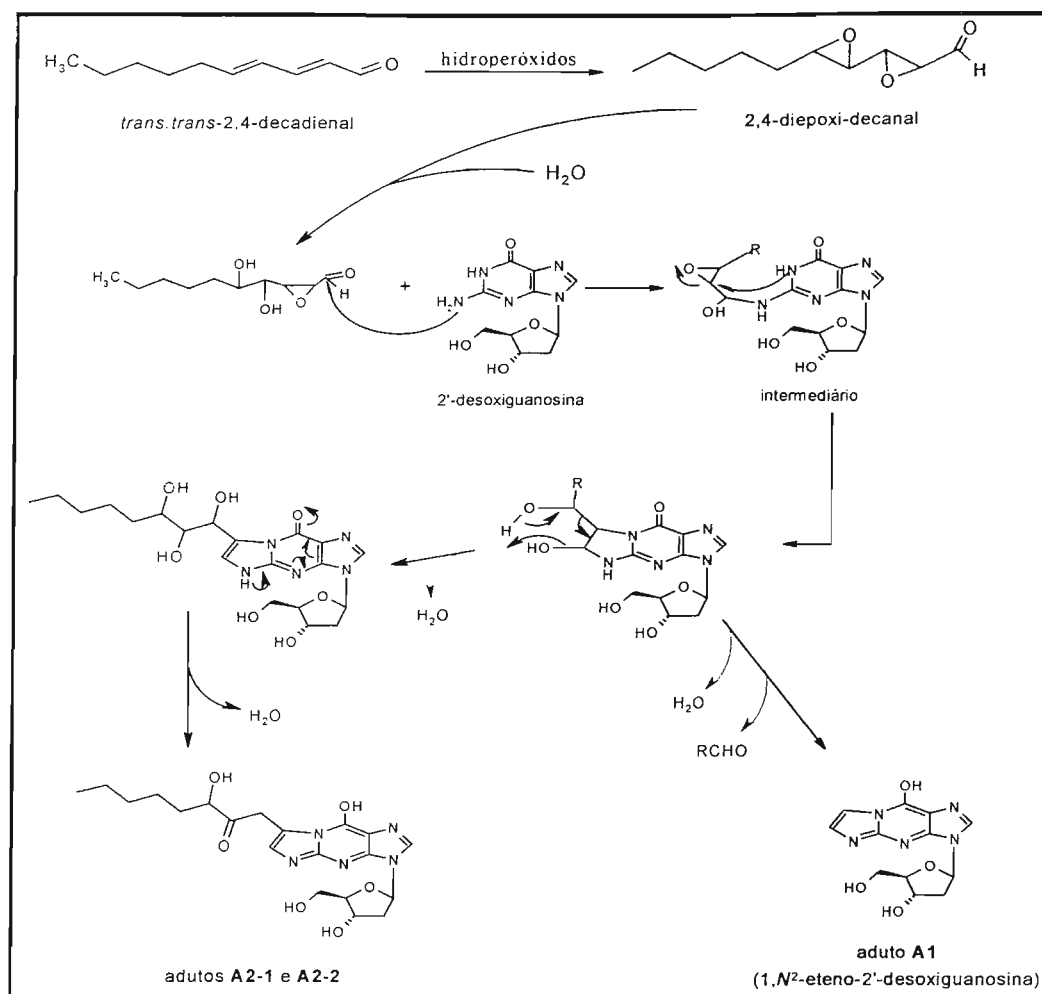
Muitos dos adutos de DNA oriundos de carcinógenos químicos são formados devido à habilidade dos agentes químicos em modular o metabolismo dos carcinógenos, um fenômeno conhecido como indução enzimática. As enzimas do citocromo P450 possuem um envolvimento no metabolismo destes carcinógenos (aldeídos, haletos de vinila, haloalcanos, cetonas) tanto na bioativação como detoxificação (Guengerich, 2001). No processo de detoxificação, eles podem ser ativados a espécies, como os epóxidos, que são reativos frente ao DNA; esta ativação também pode ocorrer via peróxidos, presentes no organismo (Marnett, 2000).

Nos últimos anos, tem sido dada grande atenção a adutos de DNA exocíclicos pois fazem parte de uma classe de lesão em DNA formada a partir de muitos carcinógenos genotóxicos (revisado por Bartsch e col., 1994). Estes adutos foram descritos pela primeira vez por Kochetkov e col. (1971), que os identificou

como análogos fluorescentes em estudos bioquímicos e “probes” estruturais de ácidos nucleicos (Leonard, 1992). Os compostos que podem levar à formação de eteno adutos podem ser divididos em dois grupos, segundo a necessidade de serem convertidos a intermediários mais reativos ou não. Os aldeídos α -halogenados, α -halocetonas são capazes de reagir diretamente com bases de DNA *in vitro*. Já, os haletos de vinila, os haloalcanos, aldeídos α,β -insaturados e cetonas precisam ser previamente convertidos em intermediários mais reativos (Guengerich, 1992; Carvalho e col., 1998; Carvalho e col., 2000; Rindgen e col., 1999; Loureiro e col., 2000; Koc & Swenberg, 2002). Esta ativação *in vivo* pode ser enzimática (via enzimas do citocromo P450) ou ocorrer com o auxílio de peróxidos obtidos da oxidação de ácidos graxos da membrana ou ainda por peróxidos que estão presentes no organismo. Esta reação entre carcinógenos químicos com DNA, tanto diretamente ou após ativação metabólica, envolve geralmente a ligação de um carcinógeno eletrofilico com o sítio nucleofílico do DNA. A guanina é o alvo mais frequente, mas há adutos formados com todas as bases (Marnett, 2000).

Os adutos exocíclicos são de grande interesse pois bloqueiam uma região do pareamento de base no DNA e aparentam ser bastante mutagênicos (Marnett & Plataras, 2001). Dentre os adutos exocíclicos de DNA, os eteno adutos vêm sendo muito estudados. Sabe-se que estes adutos podem ser formados em DNA quando este é tratado com carcinógenos como carbamato de etila, cloreto de vinila e seus oxiranos intermediários (Fernando e col., 1996; Bartsch, 1999; Loureiro e col., 2002a; Bartsch e col., 2002; Morinello, e col., 2002).

O mecanismo proposto por Nair & Offerman (1985) para a reação entre os epóxidos e a guanina envolve a adição nucleofílica do grupo amino exocíclico da guanina ao carbono aldeídico do epóxido, seguida de ciclização via ataque nucleofílico do nitrogênio 1 da guanina ao carbono do epóxido produzindo um intermediário que, após desidratação, origina os eteno adutos, neste caso, 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina (1, N^2 - ϵ dGuo). Um mecanismo semelhante foi proposto para a formação deste mesmo aduto em nosso laboratório a partir do 2,4-decadial (Esquema 1.3) (Loureiro e col., 2000).



Esquema 1.3: Mecanismo proposto para a formação de adutos a partir do 2,4-decadienal (Loureiro e col., 2000).

Há muitas hipóteses que associam os eteno adutos com o início e o progresso da carcinogênese. As propriedades pró-mutagênicas de eteno adutos foram estabelecidas em ensaios de extensão do primer *in vitro* e de mutagênese sítio específica em *E. coli* e em células de mamíferos (Bartsch, 1999; Nair e col., 1999). As eteno bases, 2'-desoxiguanosina (ϵ dGuo), 2'-desoxicitidina (ϵ dCyd), e 2'-desoxiadenosina (ϵ dAdo) produzem mutações, pois ocorrem substituições de pares de base. Como exemplo, podemos citar: ϵ dAdo que leva a transições AT \rightarrow GC e transversões AT \rightarrow TA e AT \rightarrow CG (Pandya e col., 1996; Basu e col., 1993; Bartsch, 1999) e também ϵ dCyd que leva a transversões CG \rightarrow AT e transições CG \rightarrow TA (Palejwala e col., 1993). Recentemente, Kowalczyk e col.

(2004) demonstraram que adutos de cadeia longa, derivados da reação de HNE com DNA causam recombinação, substituição de base e mutações do tipo “frameshift”, ou seja, existe uma inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos na fita de DNA.

O aumento do nível de eteno bases foi demonstrado em tecidos marcadores de carcinogênese em roedores expostos a cloreto de vinila, a etilcarbamato e seus metabólitos (Fernando e col., 1996). As lesões ϵ dAdo e ϵ dCyd também foram verificadas em pele de ratos nos quais a carcinogênese foi induzida por 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA) e promovida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Nair e col., 2000).

Os adutos $N^2,3$ - ϵ dGuo formados pela alquilação da 2'-desoxiguanosina (dGuo) também mostraram atividade mutagênica em *E. coli* tanto *in vitro* quanto *in vivo* levando a transições GC \rightarrow AT (Singer e col., 1987; Cheng e col., 1991). Já o outro aduto de dGuo, $1,N^2$ - ϵ dGuo apresentou mutagenicidade *in vivo*, levando a transições GC \rightarrow AT e transversões GC \rightarrow TA (Langouët e col., 1997; Langouët e col., 1998). Além disto, o $1,N^2$ - ϵ dGuo gera também deleções, rearranjos, duplos mutantes e substituições de pares de bases próximos ao seu sítio (Akasaka & Guengerich, 1999). Os eteno adutos mencionados estão ilustrados na figura a seguir (Fig. 1.3).

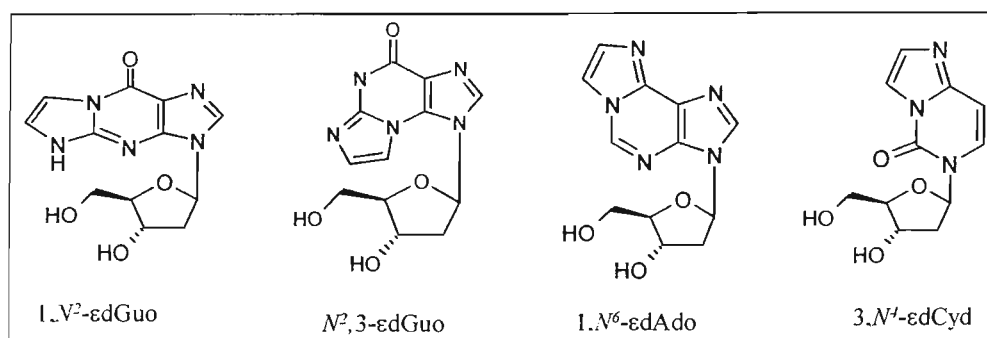


Figura 1.3: Estrutura dos eteno adutos mais estudados:

1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N²- ϵ dGuo), N^{2,3}-eteno-2'-desoxiguanosina (N^{2,3}- ϵ dGuo), 1,N⁶-eteno-2'-desoxiadenosina (ϵ dAdo), 3,N⁴-eteno-2'-desoxicitosina (ϵ dCyd).

Outros estudos que ligam os eteno adutos a carcinogênese são aqueles em que enzimas específicas de reparo reconhecem eteno adutos confirmando o fato de que estas lesões são reconhecidas pelo mecanismo de defesa celular (Bartsch, 1999; Gros e col., 2003).

Têm sido feitas associações entre a formação de adutos de DNA, a mutagênese e a tumorigênese, enquanto que a redução no nível de adutos vem sendo associada à quimioprevenção. Entretanto, os mecanismos moleculares e as conseqüências biológicas da exposição a carcinógenos ainda permanecem obscuros. Após a caracterização de um aduto de DNA específico, estudos da mutagênese sítio específica e/ou formação de tumores devem ser realizados para se determinar a importância toxicológica destas espécies (Poirier e col., 2000). Um outro fator importante é que estes adutos são quimicamente estáveis e podem ser úteis na avaliação de danos em DNA ocasionados pelo estresse oxidativo (Bartsch e col., 2002).

Adutos de DNA representam excelentes biomarcadores na determinação da extensão do dano ao material genético. Tais marcadores podem auxiliar no entendimento do mecanismo de carcinogênese e na avaliação do risco de câncer imposto por vários agentes químicos. Sendo assim, a detecção e quantificação de adutos de DNA é essencial, e constitui uma importante área de pesquisa (Bartsch & Nair, 2000; Koc & Swenberg, 2002; Farmer, 2004).

1.2.3.1 -Eteno adutos: Reparo

A maioria dos adutos de DNA formados não persiste no DNA. Há mecanismos de reparos, como reparo por excisão de bases e excisão de nucleotídeos ou ainda reparos de alquilação que podem remover muitas destas modificações em DNA. Entretanto, se não reparados, os adutos de DNA podem causar erros no pareamento durante a transcrição e levar a mutação e eventualmente ao câncer. Acredita-se que a formação de adutos de DNA pode ser um passo crítico na carcinogênese (Koc & Swenberg, 2002). Vale ressaltar que há enzimas de reparo que reconhecem os eteno adutos, confirmando o fato de que estas lesões genotóxicas de DNA são reconhecidas pelo mecanismo de defesa

celular (Bartsch, 1999). Devido a inibição dessas enzimas, ou a falta de sua expressão em certos tipos de células, alguns destes eteno adutos foram acumulados ou persistiram em DNA de células ou de tecidos de roedores (Guichard e col., 1996; Swenberg e col., 1992).

Dentre os diferentes mecanismos corretivos que as células possuem, acredita-se que o sistema de reparo por excisão de base é o responsável por eliminar a maior parte das lesões simples do DNA. Dentre estas enzimas, algumas já foram descritas em *E. coli*, como a endonuclease III (Endo III), a glicosilase de formamidopirimidina (FPG) e glicosilases de alquilações do DNA, entre outras (Jaiswal, e col., 1998). A 3-metiladenina (3-MeA)-DNA-glicosilase é capaz de reparar os adutos $N^2,3$ - ϵ dGuo e ϵ dAdo (Matijasevic e col., 1992; Saparbaev e col., 1995). A lesão ϵ dCyd é reparada por uma enzima ainda parcialmente purificada mas que difere da proteína alquil-*N*-purina glicosilase (ANPG) que é a homóloga humana à Alk A (Hang e col., 1996; Hang e col., 1997). A 3, N^4 -etenocitosina, que é altamente mutagênica é um substrato primário para a uracil-DNA-glicosilase de *E. Coli* e para a timina-DNA-glicosilase (Saparbaev & Laval, 1998). Também foi descrito que duas proteínas estruturalmente não relacionadas, a alquil-*N*-purina-DNA-glicosilase (ANPG) e a uracil-DNA-glicosilase de *E. coli* (MUG) retiram 1, N^2 - ϵ G de oligonucleotídeos. (Saparbaev e col., 2002; Gros e col., 2003).

1.2.3.2- Eteno adutos: Níveis e métodos de detecção

O desenvolvimento de métodos sensíveis para se detectar danos em DNA foi crucial para os estudos de danos oxidativos promovidos por compostos endógenos. (Marnett, 2000). Muitos métodos foram desenvolvidos para a quantificação de adutos de DNA. Dentre as técnicas utilizadas, temos o ^{32}P -postlabeling (PPL) (Nair e col., 1995), imunohistoquímica (Yang e col., 2000), cromatografia líquida acoplada à detecção eletroquímica, e também a cromatografia líquida com coluna de imunoafinidade acoplada à detecção por fluorescência (Nair, 1999). Ultimamente a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tem sido muito utilizada (Koc & Swenberg, 2002). A sensibilidade de cada método varia geralmente dependendo da quantidade de

DNA a ser analisado. Alguns ensaios conseguem detectar em torno de 1 aduto/ 10^9 nucleotídeos (Poirier e col., 2000).

As técnicas que fazem uso da espectrometria de massa são altamente específicas devido à capacidade de fornecer informação estrutural e inequívoca quantificação do aduto através do uso de padrões internos isotopicamente marcados. A sensibilidade dos métodos de espectrometria de massa, embora mais baixa que os imunoenaios, está aumentando com o desenvolvimento do *design* da instrumentação e dos métodos de introdução de amostras. Com o desenvolvimento contínuo, esta técnica parece ter o potencial de se tornar a mais utilizada na quantificação de adutos de DNA por fornecer maior sensibilidade e especificidade. Os espectrômetros de massa estão sendo cada vez mais utilizados como resultado da diminuição do custo deste tipo de instrumentação (Koc & Swenberg, 2002).

Os derivados exocíclicos ϵ dAdo, ϵ dCyd, $N^2,3-\epsilon$ Guo foram detectados em diferentes tecidos de ratos expostos ao cloreto de vinila em níveis que variam de 2,9 a 9,8 ϵ dCyd / 10^7 dCyd, 0,4 a 2,1 ϵ dAdo/ 10^7 dAdo e 2,1 a 18,1 $N^2,3-\epsilon$ Guo/ 10^7 Guo (Eberle e col., 1989; Ciroussel e col., 1990; Fedtke e col., 1990a,b; Swenberg e col., 1992; Loureiro e col., 2002a - revisão).

Verificou-se uma indução diferenciada de $N^2,3-\epsilon$ Guo em hepatócitos de animais tratados com cloreto de vinila (1100 ppm). Após 1 semana de tratamento, o nível variou de 5,5 a 55 $N^2,3-\epsilon$ Guo/ 10^8 Guo; após um período de 4 semanas o nível obtido foi de 3 a 110 $N^2,3-\epsilon$ Guo/ 10^8 Guo (Morinello e col., 2002). Este grupo também verificou que não houve diferença nos níveis de $N^2,3-\epsilon$ Guo/ 10^8 Guo no cérebro de ratos adultos após 1 ou 4 semanas de tratamento com cloreto de vinila (1100 ppm); os níveis permaneceram semelhantes aos obtidos para os grupos controle, 5 a 5,6 $N^2,3-\epsilon$ Guo/ 10^8 Guo; sugerindo que este tipo de aduto não participa significativamente na iniciação da carcinogênese do cérebro de animais adultos expostos a esta concentração de cloreto de vinila. Em animais mais novos, verificou-se um aumento no nível do aduto de 1,5 a 4,4 $N^2,3-\epsilon$ Guo/ 10^8 Guo após 5 dias de tratamento (Morinello e col., 2002). Todos os níveis foram obtidos utilizando-se as técnicas anteriormente mencionadas.

Recentemente, foi verificada a excreção urinária de ϵ Ado em humanos, também por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os níveis variaram de 10 a 100 pmol/ 24 h (Hillestrom e col., 2004).

Chen e col., (2004), acreditam ser possível quantificar com precisão o ϵ Ado na urina em concentrações superiores a 10 pg/ mL de urina utilizando-se LC/ESI/MS-MS). Sendo assim a quantificação deste aduto poderá ser usada como um biomarcador não invasivo de lesão em DNA associado ao estresse oxidativo e em estudos para a prevenção do câncer (Chen & Chang, 2004).

1.3- Carotenóides

1.3.1- Química dos carotenóides e suas funções

Carotenóides são grupos de pigmentos naturais coloridos sintetizados pelas plantas e microorganismos, mas não por animais; levam este nome devido ao fato de terem sido isolados pela primeira vez após serem extraídos de cenouras em 1831. (Paiva & Russell, 1999; Yeh & Hu, 2000; Tapiero e col., 2004). São baseados num esqueleto isoprenóide, sendo assim, sua estrutura consiste em um longo sistema com ligações duplas e simples se alternando e que formam a parte central da molécula. Estas ligações permitem uma extensa delocalização de elétrons pela cadeia levando assim à absorção na região do visível. O esqueleto básico de um carotenóide é de 40 carbonos, entretanto podem ocorrer modificações na cadeia, como ciclização nas pontas, adição de grupos funcionais com oxigênio e ainda redução das duplas ligações (Halliwell & Gutteridge, 1999). Até hoje, mais de 600 carotenóides diferentes foram identificados. Sua estrutura básica é um esqueleto simétrico tetraterpênico formado pela conjugação de duas unidades C_{20} . Formalmente, todos os carotenóides podem ser derivados da unidade acíclica $C_{40}H_{56}$ por reações de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, e/ou oxidação. O sistema de ligações duplas conjugadas influencia em suas propriedades físicas, químicas e biológicas (van den Berg, e col., 2000).

Os carotenóides possuem características de absorverem luz (400-500 nm), sendo geralmente coloridos (vermelho, laranja e amarelo) devido ao cromóforo das ligações duplas conjugadas. Estas duplas possuem elétrons π delocalizados responsáveis por seu espectro eletrônico (Rice-Evans e col., 1997). Este tipo de composto pode ser encontrado em frutas, legumes e vegetais. Cenouras, damascos e abóboras são fontes de α e β -caroteno; tomates e melancias são fontes de licopeno e β -caroteno.

Os carotenóides são classificados segundo os seguintes grupos (Paiva & Russell, 1999):

1- Carotenóides hidrocarbonetos são conhecidos como carotenos e contêm grupos específicos no fim de sua cadeia. Como exemplo, o licopeno possui um

grupo acíclico em sua cadeia e o β -caroteno possui dois tipos de ciclohexeno no fim de sua cadeia.

2-Carotenóides oxigenados são conhecidos como xantofilas; como exemplo, há a zeaxantina, a luteína, β -criptoxantina, entre outros.

Alguns importantes carotenóides estão mostrados na figura a seguir (Fig. 1.4):

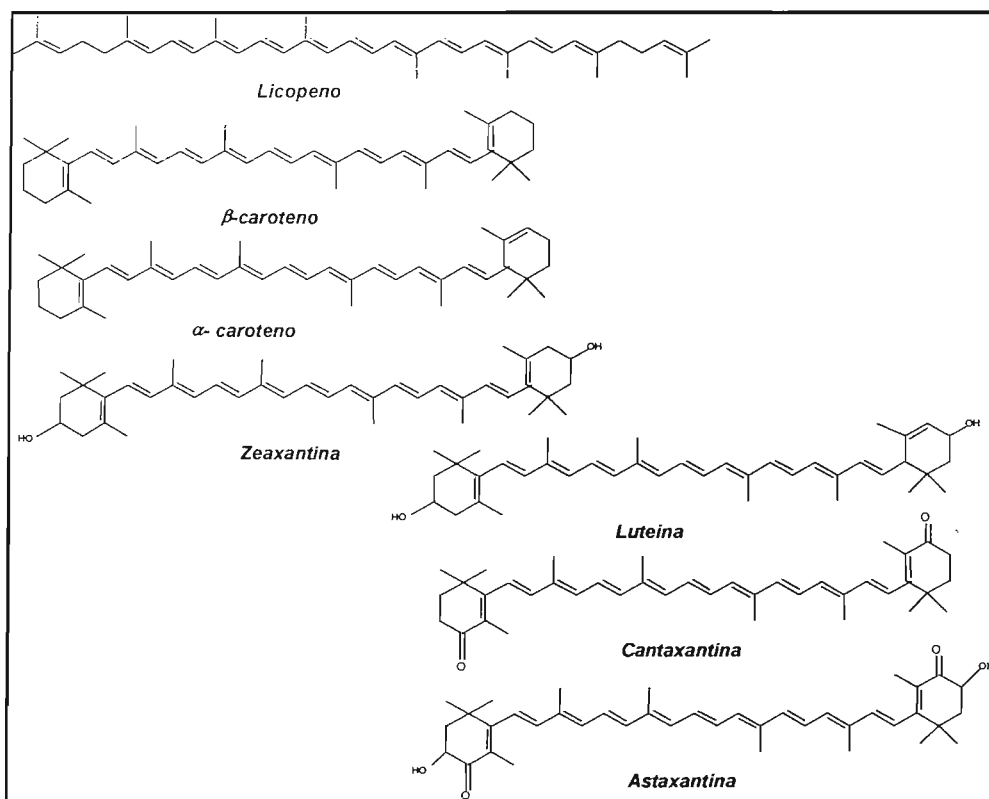


Fig. 1.4: Estrutura de alguns carotenóides encontrados em plantas e animais.

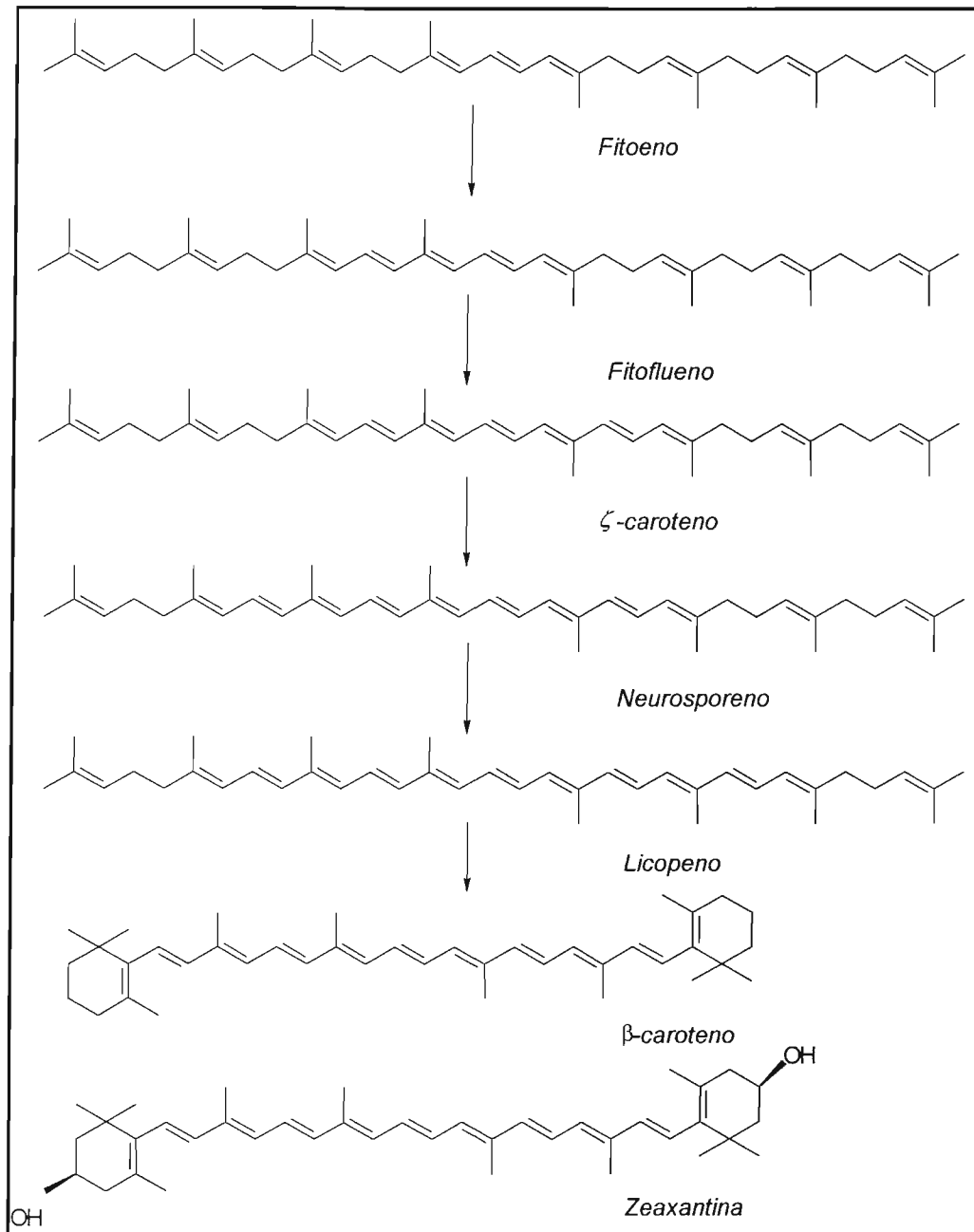
Dependendo do arranjo de seus substituintes, as ligações duplas carbono-carbono dos carotenóides podem existir em duas configurações: *cis* ou *trans* (van den Berg, e col., 2000). Em sua fonte natural, a maioria dos carotenóides encontra-se na configuração *trans* (van den Berg e col., 2000); entretanto o processamento de frutas e vegetais aumenta de 10 para 39% os isômeros *cis* (Paiva & Russell, 1999). No organismo humano, a distribuição dos isômeros varia entre os carotenóides e diferentes pares de isômeros são

encontrados em diferentes tecidos de mamíferos (Stahl e col., 1992; van den Berg e col., 2000). Os carotenóides com sistema estendido de duplas conjugadas em sua configuração totalmente *trans* são moléculas lineares (van den Berg e col., 2000). Também por seu sistema de duplas conjugadas, os carotenóides contêm um sistema rico em elétrons que é suscetível a reações com compostos eletrofilicos. Estas reações são responsáveis por sua instabilidade frente à oxidação. Na presença de oxigênio, eles se oxidam facilmente. A reação dos carotenóides com agentes oxidantes ou radicais livres depende do comprimento da cadeia e da natureza de seus grupos (Palozza & Krinsky, 1992; Sies & Stahl, 1995; Rice-Evans e col., 1997; van den Berg e col., 2000).

Os pigmentos dos carotenóides são altamente distribuídos na natureza, onde eles desenvolvem um importante papel na proteção das células e outros organismos contra oxidações. A esta classe de compostos também é dado o nome de antioxidantes biológicos.

A sequência biossintética dos carotenóides nas plantas está mostrada no Esquema 1.4 (Paiva & Russell, 1999; Bartley e col., 1995).

Cada passo enzimático do fitoeno ao licopeno adiciona uma dupla ligação à molécula, resultando no licopeno, que é uma molécula simétrica contendo 13 duplas ligações. O passo após a formação do licopeno envolve ciclização enzimática dos grupos da ponta da cadeia, resultando no γ -caroteno (um anel β) e o β -caroteno (dois anéis β). A adição de oxigênio à molécula leva à formação de xantofilas (Paiva & Russell, 1999; Bartley e col., 1995).



Esquema 1.4: Sequência biossintética dos carotenóides nas plantas

Assim como de qualquer substância, as propriedades e as funções dos carotenóides são dependentes de sua estrutura e de sua reatividade. Em particular, o sistema de duplas ligações conjugadas de seu esqueleto carbônico é considerado o fator mais importante em reações de transferência de energia, como encontrado na fotossíntese. É esta propriedade que faz com que carotenóides como o licopeno e o β -caroteno sejam supressores de oxigênio singlete (1O_2). O uso clínico do β -caroteno como um agente eficiente no tratamento de protoporfiria eritropoiética, na qual o 1O_2 é produzido via sensibilização de porfirinas livres acumuladas na pele é bem estabelecido (Mathews-Roth, 1993). Interações com outras espécies reativas de oxigênio (ROS) no organismo, incluindo espécies radicalares como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), dependem da natureza destas espécies e da estrutura dos carotenóides. Os grupos substituintes nos carotenóides podem governar sua atividade antioxidante. A atividade dos carotenóides como antioxidante frente a ROS foram examinadas, e diferenças na reatividade entre estas moléculas estão relacionadas com a densidade eletrônica dos carotenóides. Grupos cetônicos e hidroxilas podem diminuir a reatividade desta molécula prevenindo a abstração de hidrogênio nestas posições (Young & Lowe, 2001).

Moléculas no estado eletrônico excitado são capazes de reagir com compostos biologicamente importantes inativando-os. Uma das funções dos carotenóides no sistema fotossintético é bloquear essas espécies excitadas (Demming-Adams e col., 1996).

Dos mais de 600 carotenóides encontrados na natureza, apenas 40 estão presentes numa dieta humana. Dentre estes, apenas 14 e alguns de seus metabólitos foram identificados em sangue e tecidos. Muitos estudos epidemiológicos associaram altas doses de carotenóides à diminuição da incidência de doenças crônicas (Giovannucci, 1999); os mecanismos para esta proteção ainda não foram esclarecidos; entretanto existem algumas possibilidades (Paiva & Russel, 1999):

- 1) Certos carotenóides podem ser convertidos a retinóides (isto é: possuem atividade pró-vitamina A);
- 2) Podem modular atividades enzimáticas de lipogêneses (moléculas pró-inflamatórias e moléculas imunomodulatórias);
- 3) Podem possuir propriedades antioxidantes; e
- 4) Podem ativar a expressão de genes que codificam a mensagem para produção da proteína conexina 43, que é um componente integral das junções comunicantes necessárias para a comunicação entre células. A ativação deste gene não está associada com a capacidade antioxidante e é independente da atividade pró-vitamina A.

Por outro lado, reconhece-se que os carotenóides nos estudos epidemiológicos podem estar servindo como marcadores para outros fatores protetores existentes em frutas e vegetais, mas não são os reais agentes efetores (Paiva e Russell, 1999).

1.3.2- Carotenóides: absorção e efeitos na saúde humana

Alimentos contendo um amplo espectro de carotenóides são ingeridos por seres humanos e animais. A maior função de aproximadamente 50 dos 600 carotenóides na natureza é sua conversão à vitamina A (Olson & Krinsky, 1995). Nos humanos o principal carotenóide com esta função é o β -caroteno (Halliwell & Gutteridge, 1999). A disponibilidade dos carotenóides das matrizes dos alimentos, sua solubilização no intestino, que requer a presença de gorduras e ácidos cólicos conjugados da bile, e sua absorção nas mucosas intestinais são processos importantes. Uma vez nas células, os carotenóides são metabolizados pela clivagem oxidativa por uma ou mais rotas para formarem retinal, ácido retinóico e retinol (vitamina A) e pequenas quantidades de produtos de clivagem, os β -apocarotenais (Olson & Krinsky, 1995).

Carotenóides são transportados por lipoproteínas no plasma. Os carotenóides da função de hidrocarbonetos estão principalmente associados à lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as xantofilas estão distribuídas entre as LDL e as lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Olson & Krinsky, 1995).

Os carotenóides absorvidos da dieta são encontrados em maior quantidade no tecido adiposo (80-85% do total) e fígado (8-12%), mas a concentração mais alta é verificada no corpo lúteo do ovário e nas glândulas adrenais. O nível de carotenóides no plasma varia amplamente com a dieta. O nível de carotenóides como licopeno e β -caroteno no plasma humano varia entre 0,5-1 μ M e 0,3-0,6 μ M, respectivamente (Halliwell & Gutteridge, 1999). A literatura mostra que dos mais de 600 carotenóides conhecidos na natureza, em torno de 20 são encontrados no plasma e nos tecidos. O licopeno é o carotenóide predominante do plasma humano e possui meia vida de aproximadamente 2 a 3 dias. Os produtos à base de tomate, como sucos, "ketchup", sopa e molhos são os maiores contribuintes do licopeno na dieta (Hadley e col., 2003; Tapiero e col., 2004).

Associa-se o alto consumo de frutas e vegetais a uma diminuição do risco de se adquirir certas doenças como, por exemplo, o câncer. Os carotenóides têm sido apontados como agentes protetores em algumas formas de câncer, como esofágico, cervical, gástrico, além de algumas formas de doenças degenerativas como catarata e doenças do coração (Mayne, 1996; Burri, 1997). Estes compostos foram utilizados com sucesso por muitos anos no tratamento de indivíduos que sofrem de protoporfiria eritropoiética e outras fotossensibilidades (Mathews-Roth, 1993).

Estudos epidemiológicos mostraram a associação destes componentes com a incidência de doenças crônicas, mas não definem relações específicas de causa e efeito. As indicações são de que carotenóides, provavelmente em associação com uma variedade de outros componentes das frutas, legumes e vegetais parecem possuir efeitos protetores contra pelo menos algumas doenças crônicas e condições pré-carcinogênicas (Olson & Krinsky, 1995). Foi verificado que uma alta concentração de carotenóides no sangue está associada a uma diminuição na incidência de certas formas de câncer. Os carotenóides podem estar agindo de maneira a facilitar a comunicação entre as células via junções comunicantes, estimulando a síntese de proteínas de conexão; com este aumento da comunicação entre as células, diminui o crescimento de células transformadas (Halliwell & Gutteridge, 1999; Stahl e col., 2000).

Outros carotenóides que não possuem atividade pró-vitamina A, como o licopeno, também têm atraído muita atenção por mostrarem um efeito benéfico para a saúde humana. O alto consumo de alimentos como o tomate, rico em licopeno e o alto nível plasmático deste carotenóide estão associados à redução do risco de câncer de próstata, e também no desenvolvimento de aterosclerose (Giovannucci e col., 1995, Gann e col., 1999, Klipstein-Grobusch e col., 2000, Suganuma e col., 1999).

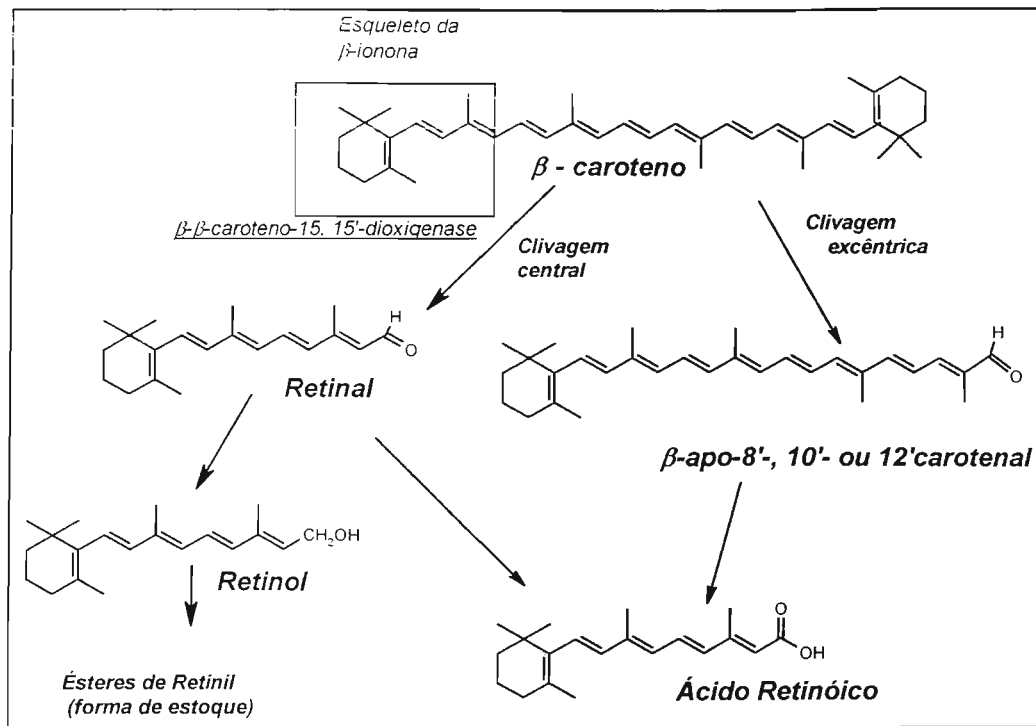
1.3.3- Atividade pró – vitamina A dos carotenóides

Uma das funções mais estabelecidas dos carotenóides é servir como precursor da vitamina A ou retinol, que é essencial para o crescimento, diferenciação celular e para a visão. A carência de vitamina A leva a chamada “cegueira noturna” que ataca geralmente crianças chegando a 250.000 por ano (Halliwell e Gutteridge, 1999 e Burri, 1997).

O grande avanço no entendimento do papel dos carotenóides na bioquímica dos vertebrados veio principalmente de estudos com a vitamina A. A deficiência de vitamina A em mamíferos, que leva à cegueira noturna, é prevenida pelo consumo de fígado e plantas verdes. Entretanto, as plantas verdes não possuem vitamina A pré-formada como o fígado. Esta observação levou à hipótese de que animais, de alguma maneira devem converter carotenóides em vitamina A (Handelman, 2001). Já foi possível fazer a clonagem do cDNA que codifica esta enzima (β,β -caroteno-15, 15'-dioxigenase) de *Drosófila* e de um segundo tipo de enzima que faz a clivagem assimétrica do β -caroteno (Kiefer e col., 2001).

E conhecido que mais de 50 carotenóides podem gerar a vitamina A, entretanto nos seres humanos a principal fonte é provavelmente o β -caroteno. O β -caroteno é oxidado e clivado para formar duas moléculas do aldeído retinal, e uma pequena fração deste é oxidada a ácido retinóico, sendo o restante reduzido a retinol (Halliwell e Gutteridge, 1999). Vale salientar que o mecanismo biológico dos carotenóides não é apenas limitado à produção de retinóides mas também ao aparato fotossintético das plantas contra danos provocados pela luz (Rosseau e col., 1992).

As propriedades para que um carotenóide em particular possua a habilidade de agir como precursor da vitamina A já foram estabelecidas: se metade da molécula possuir a estrutura de β -ionona, então o carotenóide pode ser convertido à vitamina A. Assim, β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina e muitos outros carotenóides podem contribuir na nutrição para que os níveis necessários de vitamina A sejam atingidos (Handelman, 2001). O β -caroteno em seu processo de formação da vitamina A (clivagem central do β -caroteno) sob a ação da enzima β , β -caroteno-15, 15'-dioxigenase, pode ainda formar outros produtos quando clivado de forma excêntrica, levando à formação de produtos como apo-carotenais possivelmente por uma enzima que compartilha uma seqüência de aminoácido semelhante à da clivagem central (Esquema 1.5) (Lintig & Wyss, 2001; Kiefer e col., 2001). Entretanto em estudos com ratos, a clivagem levando à formação de retinóides parece ser a preferencial (Barua & Olson, 2000). Uma fração do retinal é oxidada a ácido retinóico, sendo o restante reduzido a retinol. A forma de estoque da vitamina A no organismo é o éster de retinol (Wang e col., 1991, Wang e col., 1996, Kim e col., 2001). Vale ressaltar estudos que mostraram que a lipoperoxidação do ácido araquidônico leva a uma inibição enzimática da conversão do β -caroteno em vitamina A, mostrando que lipoperóxidos e/ ou produtos de sua homólise podem inibir esta conversão, confirmando a importância do papel de outros antioxidantes naturais na manutenção do conteúdo estável de vitamina A nos mamíferos (Gessler, 2001).



Esquema 1.5: Mecanismo de clivagem do β -caroteno em animais (Lintig & Wyss, 2001).

As oxidações enzimáticas de carotenóides com atividade pró-vitamina A possuem um papel essencial no suprimento desta vitamina em vertebrados. Sabe-se também que a clivagem de produtos como retinal e β -apo-carotenais, que são produzidos a partir do β -caroteno por oxidações não enzimáticas, também pode ocorrer por auto-oxidação em solventes, oxidações por radicais livres, oxigênio singlete e fumaça de cigarro (Handelman e col., 1991, Mordi, e col., 1993, Stratton, e col., 1993, Baker e col., 1999).

1.3.4- Carotenóides e junções comunicantes intercelulares (Gap Junctional Communication)

A comunicação intercelular é necessária em organismos complexos e diferenciados para coordenar as atividades celulares da diferenciação e crescimento. Dois modos de comunicação intercelulares contribuem para esta coordenação: uma forma envolve a secreção de substâncias sinalizadoras como neurotransmissores, hormônios e fatores de crescimento no fluido extracelular. Células alvos que expressam receptores a estas substâncias respondem apropriadamente até encontrarem os respectivos moduladores químicos. A outra forma de comunicação opera dentro da membrana plasmática de grupos de células que se acoplam dentro de estruturas integradas (gap junctions) que permitem a difusão de moléculas de baixo peso molecular (Trosko & Ruch, 1998).

As junções comunicantes, canais de membranas, permitem a passagem de pequenas moléculas (< 1kDa) como mensageiros secundários ou sinais iônicos de uma célula a outra. O nome “gap” deriva da distância entre duas membranas opostas de células vizinhas conectadas por canais. Cada junção comunicante é composta de dois hexâmeros, denominados conexões que, por sua vez são compostos por seis subunidades denominadas conexinas (Simon & Goodenough, 1998; Donaldson e col., 1997).

Pelo menos 14 conexinas de mamíferos foram identificadas de acordo com seu peso molecular (Donahue, 2000). Um exemplo delas, a conexina 43, é expressa em uma variedade de órgãos incluindo pele, lentes e córnea dos olhos, músculos cardíacos, células espumosas, cérebro, rim e intestino (Dealy e col., 1994; Forge e col., 1999; Vaney, 1999; Nadarajah & Parnavelas, 1999; Severs, 1999; Kistler e col., 1999). A figura a seguir ilustra os canais intercelulares das junções comunicantes (Figura 1.5).

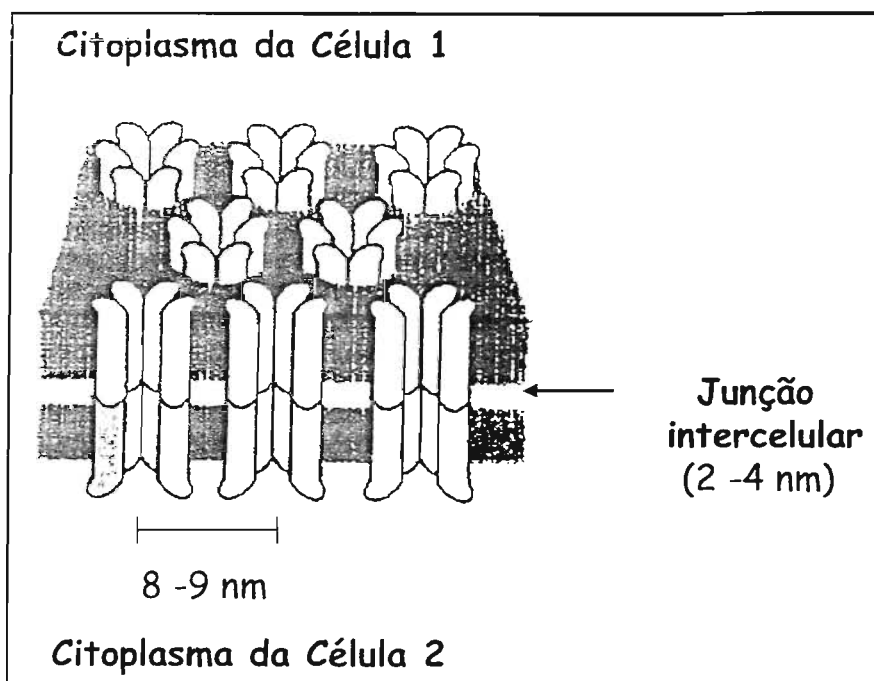


Figura 1.5: Junções comunicantes são canais intercelulares agrupados próximos às membranas plasmáticas de duas células (Simon & Goodenough, 1998).

A comunicação celular através das junções comunicantes é comumente medida por três maneiras: eletrofisiologicamente, pela transferência de um corante fluorescente (geralmente “lúcifer yellow”) ou por cooperação metabólica (Loewenstein, 1979). Devido ao fato de as junções serem únicas em sua habilidade de transferir moléculas tão grandes como o corante “lucifer yellow” intercelularmente, a transferência do corante é usada como método padrão.

A permeabilidade das junções comunicantes é rápida (dentro de segundos) e diminui reversivelmente com manipulações experimentais que diminuem o pH citossólico ou aumentam a concentração de íons Ca^{+2} livres. Estas observações indicam que os canais das junções comunicantes levam a uma alteração reversível conformacional que fecha o canal em resposta a mudanças na célula. Promotores de tumor (ésteres de forbol), fatores de crescimentos (insulina, fatores de crescimentos de fibroblastos, fatores de crescimentos epidérmicos), e oncogenes (ras, raf, scr) diminuem a comunicação

intercelular via junções comunicantes. Já o cAMP via proteína quinase A (Spray e col., 1985), carotenóides (Zhang e col., 1991), vitamina D (Stahl, e col., 1994), retinóides (Hossain e col., 1989; Hossain e col., 1993) aumentam a comunicação intercelular via junções comunicantes.

As junções comunicantes fornecem um mecanismo para a coordenação de grupos celulares. No coração, as junções comunicantes permitem a rápida transferência intercelular de potenciais de ação, possibilitando a contração dos cardiomiócitos (Severs, 1999). As junções comunicantes podem ser também supressoras de mutações em células somáticas em enzimas metabólicas e sinalizadoras. Células normais levam intermediários permeáveis a estas junções, permitindo a sobrevivência de células mutantes em caminhos enzimáticos bloqueados. Neste último caso, as junções comunicantes também servem como supressores de tumores, já que células tumorais tendem a diminuir a comunicação intercelular via junções comunicantes que por sua vez promovem a carência do controle de crescimento de diferenciação destas células (Holder e col., 1993; Yamasaki e col., 1995).

Os carotenóides são também capazes de aumentar a comunicação intercelular via junções comunicantes e de induzirem a síntese da conexina 43, um componente da estrutura da junção comunicante (Zhang e col., 1991; Zhang e col., 1992; Sharoni e col., 2004). A perda da junção comunicante ocorre em transformações malignas e seu restabelecimento pode reverter os processos malignos (Trosko & Chang, 2001; Hotz-Wagenblatt & Shalloway, 1993). O efeito dos carotenóides nas junções comunicantes é independente de sua atividade pró-vitamina A ou de suas propriedades antioxidantes (Sharoni e col., 2004).

Efeitos de estimulação nas junções comunicantes intercelulares foram verificados pelo tratamento com licopeno, que também afeta o crescimento celular; o licopeno também afeta a expressão da conexina 43, um gene ligado as proteínas das junções comunicantes (Hotz-Wagenblatt & Shalloway e col., 1993; Stahl e col., 2000; Stahl & Sies, 1996; Bertran, 1999; Krutovskikh e col., 1997). A literatura relata que alguns carotenóides oxidados, como licopeno e a cantaxantina levam a um aumento na comunicação celular (Zhang e col., 1991; Hanusch e col., 1995; Krutovskikh e col., 1997; Livny e col., 2002; Aust e col., 2003; Krinsky & Yeum, 2003; Teicher e col., 1999).

1.3.5- Ação antioxidante dos carotenóides

Antioxidante é definido como uma substância que, quando presente em baixas concentrações relativas a um substrato oxidável, pode suprimir, retardar ou prevenir a oxidação deste substrato. Sua atividade é determinada por vários fatores, dentre eles (Rice-Evans e col., 1997; Halliwell, 1990):

- 1- Sua reatividade química como doador de elétrons ou de hidrogênio na redução do radical livre.
- 2- Onde se destina seu radical derivado antioxidante que foi formado em sua ação e à habilidade deste em estabilizar e delocalizar elétron desemparelhado através de um sistema de duplas conjugadas.
- 3- Sua reatividade frente à presença de outros antioxidantes.
- 4- Sua reatividade frente ao oxigênio molecular.

Há consideráveis evidências epidemiológicas mostrando que dietas ricas em frutas, grãos e vegetais apresentam um efeito protetor contra várias doenças humanas, especialmente doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. As vitaminas C e E contribuem em parte para este efeito protetor, mas há ainda outros agentes constituintes destes nutrientes que podem exercer efeitos antioxidantes adicionais, ou efeitos protetores agindo por diferentes mecanismos. Em termos de antioxidantes, os carotenóides têm recebido atenção particular, principalmente o β -caroteno e o licopeno pois estes são encontrados em altas concentrações em sangue humano (Yeh & Hu, 2000); entretanto, as evidências da importância destes antioxidantes *in vivo* ainda é restrita (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Sabe-se que espécies reativas de oxigênio podem lesar o DNA, proteínas estruturais, carboidratos, enzimas e especialmente lipídios componentes de membranas. O estresse oxidativo pode levar a doenças como Alzheimer, aterosclerose, Parkinson, catarata e câncer. O β -caroteno protege contra radicais livres que levam a danos oxidativos. Além do fato de ser o mais abundante

carotenóide de dietas. é um dos antioxidantes mais eficientes, agindo como um ótimo supressor de oxigênio singlete (Rosseau e col., 1992).

A ação antioxidante dos carotenóides está ligada à sua habilidade de suprimir o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e prevenir a lipoperoxidação *in vitro* causada por este mesmo agente. Somando-se ao efeito supressor do $^1\text{O}_2$, os carotenóides podem interceptar o passo de propagação da lipoperoxidação *in vitro*. O radical centrado no carbono formado é estabilizado pela presença das duplas conjugadas que favorecem a ressonância (Krinsky, 1989; Sies & Stahl, 1996; Rice-Evans e col., 1997; Tapiero e col., 2004). Moléculas no estado eletrônico excitado são capazes de reagir com compostos biologicamente importantes inativando-os (Demming-Adams e col., 1996). A eficiência da transferência de energia do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) para os carotenóides é alta, o que os torna efetivos sequestradores (quenchers) de $^1\text{O}_2$ (Conn e col., 1991). Para esta função, existem dois diferentes mecanismos: o “quenching” físico e o químico. O primeiro envolve a desativação do $^1\text{O}_2$ por transferência de energia do oxigênio no estado eletrônico excitado ao carotenóide levando o carotenóide, ao estado eletronicamente excitado, triplete, sendo que a energia deste composto é dissipada por interações vibracionais com o solvente recuperando o estado fundamental do carotenóide. O “quenching” químico, por outro lado, contribui com menos de 0,05% do total do “quenching” de $^1\text{O}_2$ pelos carotenóides, mas é responsável pela eventual destruição da molécula (van den Berg e col., 2000). Com isso, a atividade antioxidante do β -caroteno e de outros carotenóides não reflete sua velocidade de sequestrar um radical livre, mas sim a reatividade do derivado radicalar do β -caroteno formado, ou seja a estabilidade do radical centrado no carbono que é formado (Rice-Evans e col., 1997). Alguns dos possíveis mecanismos para a proteção de carotenóides como o β -caroteno contra o oxigênio singlete são: (1) filtração física da luz UV ambiente, (2) supressão de $^1\text{O}_2$ ou do fotossintetizador no estado triplete, (3) reparo e estabilização de membranas (Rosseau e col., 1992). O item (2) é o mais fundamentado experimentalmente; sabe-se que o β -caroteno suprime o $^1\text{O}_2$ com uma eficiência representada pela constante acima do limite de difusão de $k_q = 1.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Já o licopeno que é um carotenóide de cadeia linear, é o supressor biológico mais eficiente ($k_q = 3.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Di Mascio, e col., 1989).

Como já dito, o β -caroteno é um modulador fisiológico. Além disso, ele é um tipo incomum de reagente redox biológico, que reduz produtos de oxidação de maneira mais eficiente em baixas pressões de oxigênio (15 torr), que são existentes em muitos tecidos fisiológicos (Burri, 1997). A literatura sugere um efeito pró-oxidante deste carotenóide a elevadas pressões de oxigênio (760 torr) (Burton, 1989; Burton & Ingold, 1984; Krinsky, 1993; Palozza e col., 1997).

Além de todas estas funções aqui citadas, sabe-se ainda que o β -caroteno age também no sistema imunológico. Esta influência do β -caroteno neste sistema foi descoberta em estudos nos quais ratos debilitados foram suplementados com β -caroteno. Os ratos tratados com β -caroteno tiveram o número e a severidade das infecções respiratórias diminuídas, além de que muitos conseguiram vencer a infecção. Provavelmente o β -caroteno deve estar ligado à proliferação das células B e T, sendo que estas últimas ajudam no crescimento celular (Burri, 1997). Foi verificado que herbívoros suplementados com β -caroteno tiveram sua fertilidade aumentada, entretanto outros estudos não confirmaram estes resultados, o que torna este assunto ainda tema de discussão (Burri, 1997). *In vivo*, o β -caroteno pareceu funcionar como sequestrador de 1O_2 e como antioxidante, fazendo com que fosse diminuída a oxidação do DNA e de proteínas (Burri, 1997).

Muitos dos estudos relacionando a ação antioxidante dos carotenóides *in vitro* envolvem a sua capacidade de inibirem a lipoperoxidação (Krinsky, 1989; Palozza & Krinsky, 1992; Rosseau e col., 1992). Entretanto, a maioria dos dados sobre lipoperoxidação é derivada de medidas de produção de malonaldeído (MDA), através da análise de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Essa medida é inespecífica, dificultando a análise dos resultados. Por exemplo, foi demonstrado que a oxidação do β -caroteno por dióxido de nitrogênio leva a produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Kikugawa e col., 1999; Krinsky, 2001).

A ação antioxidante dos carotenóides *in vivo* foi mostrada utilizando-se animais como modelo, nos quais os pigmentos foram injetados ou adicionados na dieta (Palozza & Krinsky, 1992). Alguns destes estudos mostraram que o β -caroteno suprimiu a lipoperoxidação em tecidos de ratos induzida por radiação ultravioleta; injeção de tetracloreto de carbono, ou ainda pelo consumo de óleo

oxidado (Lomnisky e col., 1997; Iyama e col., 1996; Levin e col., 1997; Paiva & Russell, 1999). Outros estudos mostraram ainda que o β -caroteno pode inibir a aterosclerose em coelhos com dieta rica em colesterol, porém o mecanismo pode não ser por sua ação antioxidante (Shaish e col., 1995; Paiva & Russell, 1999). Na tentativa de se demonstrar a ação protetora dos carotenóides contra a tumorigênese, muitos estudos falharam. O β -caroteno não protegeu ratos contra dois estágios de tumores de pele induzidos por benzopireno (Lambert e col., 1990; Paiva & Russell, 1999). Um marcador de lesão em DNA, a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), também foi utilizada com este intuito e não foi verificada sua diminuição na urina ou linfócitos de indivíduos suplementados com β -caroteno, luteína ou licopeno (van Poppel e col., 1995; Collins e col., 1998; Krinsky, 2001). Entretanto há relatos de uma diminuição significativa no nível de 8-oxodGuo após suplementação com suco de cenoura (Pool-Zobel e col., 1997) ou com o aumento do consumo de frutas e vegetais (Haeghele e col., 2000; Krinsky, 2001).

Estudos epidemiológicos mostraram uma relação inversa entre a ingestão de frutas e vegetais com os riscos de se adquirir vários tipos de câncer, e isto vem sendo atribuído ao β -caroteno contido nas frutas e nos vegetais (Peto e col., 1981). Estudos realizados *in vitro* e em animais têm dado suporte a esta hipótese. Notavelmente, o β -caroteno é mostrado como um eficiente antioxidante por seqüestrar certas espécies reativas de oxigênio, especialmente radicais peroxila e o oxigênio singlete. Recentemente, foi mostrado o efeito protetor do β -caroteno, sobre os raios UVA e luz visível induzidos por foto-oxidação em pele de ratos, e a diminuição da lesão em DNA mitocondrial por raios UVA (Terao e col., 2001; Eicker e col., 2003). Esta atividade antioxidante parece ser maior a baixas tensões de oxigênio (Burton & Ingold, 1984).

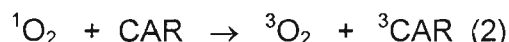
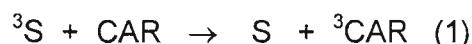
Muitos estudos mostram que os carotenóides podem interagir com outros antioxidantes. Estas interações foram confirmadas por Blakely e col. (1988) que mostraram que o β -caroteno pode modular o aumento da superóxido dismutase induzido por radicais peroxila produzidos por uma dieta rica em gordura (Palozza & Krinsky, 1992). Mayne e Parker mostraram também que (Mayne & Parker, 1989) a adição da cantaxantina na dieta de frangos deficientes em vitamina E e

selênio, aumentou a resistência a lipoperoxidação pelo aumento no nível de α -tocoferol nas membranas (Palozza & Krinsky, 1992).

As implicações do mecanismo de ação do β -caroteno e de outros carotenóides em enfermidades humanas nas quais imagina-se que espécies reativas estejam envolvidas como por exemplo, em doenças como catarata, aterosclerose, câncer são muito significativas devido ao fato de se conhecer sua baixa toxicidade; e também porque se sabe que este composto e outros carotenóides podem agir como agentes de quimioproteção (Palozza e Krinsky, 1992).

1.3.5.1- Fotoproteção

A habilidade dos carotenóides em capturar, por um processo de transferência de energia, tanto sensitizadores tripletes (3S) quanto oxigênio singlete (1O_2) gerados por transferência de energia a partir do 3S ao estado fundamental do oxigênio (3O_2) é responsável por sua proteção contra reações fotosensitizadas (Palozza e Krinsky, 1992).



A reação acima limita o potencial deletério de espécies 3S que é capaz de gerar 1O_2 . Este por sua vez pode inativar proteínas na peroxidação de lipídios biológicos e ainda lesar o DNA (Palozza e Krinsky, 1992).

O carotenóide triplete formado perde sua energia para o ambiente e retorna a sua forma original (3).

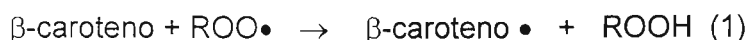


1.3.5.2- Reações com radicais de oxigênio

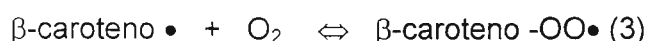
Um grande número de estudos mostra a ação dos carotenóides em limitar o dano oxidativo induzido por ROS. O β -caroteno é capaz, por exemplo de

reduzir o dano induzido pela xantina oxidase, assim como inibir a lipoperoxidação induzida por fontes enzimáticas como as do sistema xantina oxidase, NADPH e citocromo P450 redutases (Palozza & Krinsky, 1992).

Há fortes evidências de que os carotenóides são eficientes sequestradores de radicais peroxila, entretanto o mecanismo de sua ação antioxidante ainda não está bem definido. Burton & Ingold propuseram uma hipótese para este mecanismo. É esperada que a reação entre o β -caroteno e o radical peroxila forme uma espécie de carotenóide radical (1); estes pesquisadores acreditam que o β -caroteno reage direto com o radical peroxila formando uma espécie estabilizada por ressonância com um radical centrado no carbono (2) (Burton & Ingold, 1984; Palozza & Krinsky, 1992).



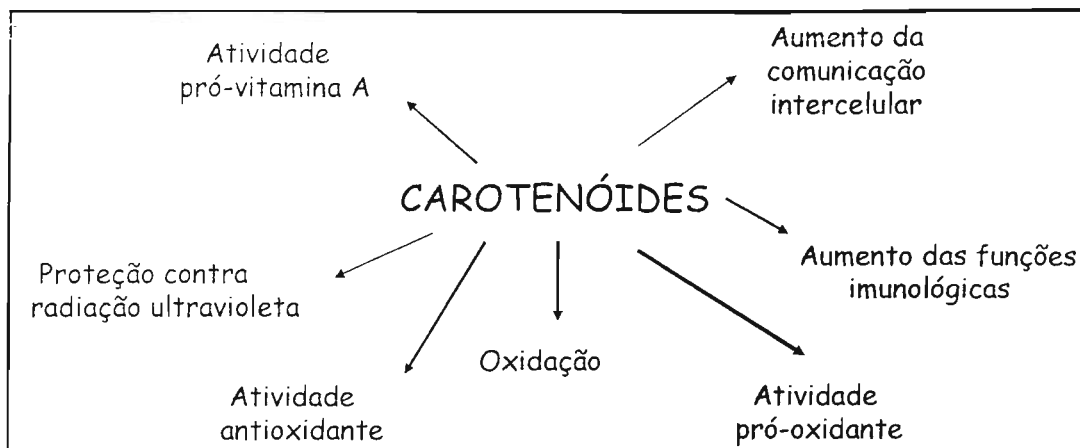
A combinação do carotenóide radical com oxigênio pode levar a formação de um carotenóide peróxi-radical (3), que, em baixa concentração de oxigênio pode deslocar o equilíbrio para a esquerda reduzindo assim a cadeia carregadora do radical peroxila. Entretanto, se a concentração de oxigênio for alta, o equilíbrio fica deslocado para a direita e, devido à auto-oxidação, o radical formado é capaz de agir como pró-oxidante (Palozza & Krinsky, 1992).



Além disso o complexo peroxil- β -caroteno pode reagir como outro radical peroxila levando à terminação da cadeia, como apresentado a seguir (4) (Palozza & Krinsky, 1992).



O esquema 1.6 resume algumas propriedades dos carotenóides.



Esquema 1.6: Propriedades dos carotenóides.

1.3.6- Ação pró-oxidante dos carotenóides

O efeito pró-oxidante é definido como a reação que promove uma atividade oxidativa ou um desbalanço pró-oxidante/antioxidante em direção a uma atividade oxidante (Palozza, 1998). O efeito pró-oxidante pode induzir o estresse oxidativo. Um agente pró-oxidante em sistemas biológicos aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que podem destruir defesas antioxidantes causando danos às membranas celulares (Halliwell & Gutteridge, 1999), às proteínas (Davies, 1987), e também ao DNA (Imalay & Linn, 1988; Zhang & Omaye, 2001).

O conceito de que os carotenóides se comportam como pró-oxidantes é derivado das conclusões de Burton e Ingold (1984), que mostraram que a tensões altas e não fisiológicas de oxigênio (760 torr, 100% oxigênio) e em concentrações relativamente elevadas de β -caroteno ($> 500 \mu\text{M}$) esse carotenóide se comporta como pró-oxidante.

A ação pró-oxidante do β -caroteno pode ser devido à formação de radicais peroxila e/ou por sua rápida velocidade de auto-oxidação. A atividade pró-oxidante/antioxidante do β -caroteno é dependente da pressão de oxigênio. A baixas pressões, ele age como um bloqueador de cadeia da lipoperoxidação

(ação antioxidante), e com o aumento da pressão de oxigênio, ele é facilmente oxidado e exibe comportamento pró-oxidante. Esta propriedade antioxidante foi demonstrada pela habilidade do β -caroteno em proteger metil linoleato contra a oxidação por radicais formados pela decomposição térmica do azo(bis)isobutironitrila (AIBN) (Rosseau e col., 1992). As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) quando oxidadas podem iniciar o processo de aterosclerose, e são também umas das maiores carregadoras de β -caroteno em humanos. Estudos realizados utilizando-se o cobre como pró-oxidante, demonstraram que o nível de oxidação delas está altamente relacionado ao nível de antioxidantes. A presença destes últimos prolonga a fase "lag" que precede a rápida oxidação das LDLs (Palozza & Krinsky, 1992).

O mecanismo pelo qual a pressão de oxigênio deve agir para mudar o comportamento do β -caroteno de anti para pró-oxidante ainda não está claro (Palozza, 1998). Outro estudo mostrou que tanto o β -caroteno quanto o licopeno podem aumentar o nível de TBARS dependendo do agente oxidante utilizado *in vitro* (Yeh & Hu, 2000). Entretanto, analisando-se melhor estes estudos, verificou-se que o que acontece é uma perda na atividade antioxidante sob estas condições (Krinsky, 2001). A atividade pró-oxidante do β -caroteno também foi verificada em estudos nos quais fibroblastos humanos foram irradiados com raios ultravioleta UVA e não foi observada proteção pelo carotenóide. O β -caroteno estimulou a resposta oxidativa em fibroblastos epiteliais (Obermüller-Jevic e col., 1999; Obermüller-Jevic e col., 2001; Biesalsky & Obermüller-Jevic, 2001).

Uma grande evidência da atividade pró-oxidante do β -caroteno é sua interação com outros antioxidantes. Estes por sua vez, limitam o caráter pró-oxidante do β -caroteno. Em membranas celulares isoladas, o α -tocoferol inibe o aumento na peroxidação lipídica induzida por altas doses de β -caroteno (Palozza e col., 1995). Além disso, em diferentes células tumorais, o efeito pró-oxidante do β -caroteno é completamente revertido pela concomitante adição de α -tocoferol (Palozza e col., 2001; Palozza e col., 2002). Em particular, o tocoferol é capaz de minimizar o aumento da produção de ROS induzida por altas concentrações de β -caroteno tanto em adenocarcinoma de cólon humano (Palozza e col., 2001) como em células de leucemia (Palozza e col., 2002). Além disso, o tocoferol é capaz de

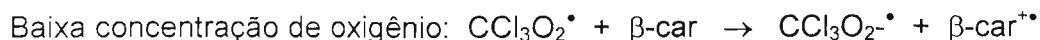
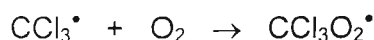
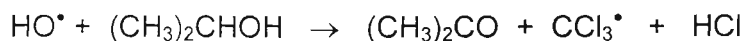
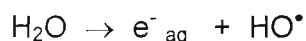
impedir a perda da glutathiona reduzida e do aumento da glutathiona oxidada induzida pelo carotenóide em células HL-60 (Palozza e col., 2002). O tocoferol também pode reverter o efeito do carotenóide na ativação de NF-kB em muitos modelos celulares (Palozza e col., 2003a). É interessante notar que a prevenção dos efeitos pró-oxidantes do β -caroteno por α -tocoferol ou outros antioxidantes como a *N*-acetilcisteína é sempre acompanhada pela perda do efeito do β -caroteno no crescimento celular e na indução de apoptose (Palozza e col., 2003b – para revisão).

1.3.7 - Possíveis mecanismos pró e antioxidante do β -caroteno

Como já mencionado aqui, Burton e Ingold (1984) mostraram que o β -caroteno é um tipo de antioxidante não usual, já que seu comportamento depende da pressão parcial de oxigênio. O estudo deste fenômeno foi retomado após os estudos epidemiológicos que forneceram resultados contraditórios sobre o β -caroteno (Burton & Ingold, 1984; Truscott, 1996).

Truscott em um estudo anterior usou CCl_3^\bullet como modelo de radical peroxila (ROO^\bullet) para propor um mecanismo molecular. A radiólise de pulso sobre CCl_4 poderia produzir CCl_3^\bullet em solução alcoólica; esta espécie por sua vez reage rapidamente com O_2 e gera o radical $\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$. Na presença do β -caroteno, os produtos reacionais dependerão da concentração de oxigênio. A baixas concentrações de O_2 observa-se apenas o cátion radical ($\beta\text{-car}^{+\bullet}$) ($\lambda=900\text{nm}$); à altas pressões observa-se a formação da espécie $\text{CCl}_3\text{O}_2\text{-}\beta\text{-car}^\bullet$ ($\lambda=820\text{nm}$). Este radical vai decaindo, formando-se assim $\beta\text{-car}^{+\bullet}$ ($\lambda=900\text{nm}$) em atmosfera normal ou em condições saturadas de O_2 (Truscott, 1996).

As reações a seguir ilustram esta explicação:

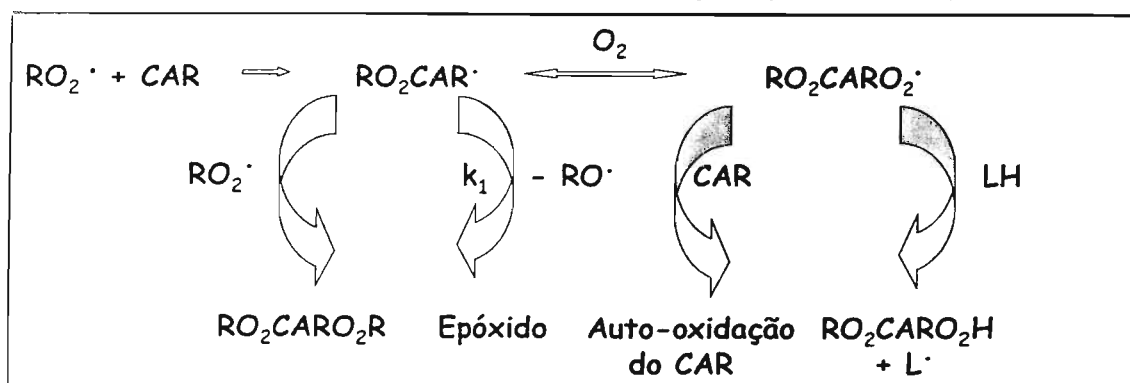


↑



Considerando-se as explicações anteriores, Truscott propôs um mecanismo para a interação do β -caroteno com radicais peroxila e oxigênio, mostrando seu possível comportamento antioxidante a baixas concentrações de oxigênio e seu comportamento pró-oxidante a altas concentrações de oxigênio (Truscott, 1996).

Num estudo mais recente, El-Agamey e col. (2004), incluindo o próprio Truscott (2004) atribuíram a dependência da concentração de oxigênio à atividade antioxidante dos carotenóides a um equilíbrio entre os radicais de carotenóides e o oxigênio. Kleinjans e col. (2004) já haviam verificado a evidência da formação de radicais centrados no carbono. De acordo com o esquema 1.7 (similar ao proposto anteriormente por Truscott, 1996), a altas concentrações de oxigênio, o equilíbrio se desloca em direção a formação da espécie $RO_2-CARO_2^{\cdot}$, que pode tanto reagir com o carotenóide (CAR), induzindo sua auto-oxidação, ou reagir com lipídios levando à fase de propagação da peroxidação lipídica. Entretanto, a baixas concentrações de oxigênio, o equilíbrio se desloca em direção ao radical peroxila do carotenóide (RO_2-CAR^{\cdot}), que pode reagir com outro radical peroxila (RO_2^{\cdot}) ou formar um epóxido via eliminação do radical alcoxila. Como a concentração do oxigênio muda de um tecido para outro, os carotenóides podem agir diferentemente de um tecido para outro (El-Agamey e col., 2004).



Esquema 1.7: Mecanismo proposto para a atividade de carotenóides frente à tensão de oxigênio (El-Agamey e col., 2004).

1.3.8- Estudos epidemiológicos com β -Caroteno

Em meio a tanta discussão sobre a atividade antioxidante dos carotenóides e sobre a possível prevenção do processo de carcinogênese promovida por estes compostos, estudos epidemiológicos foram realizados para se verificar a relação entre a ingestão de carotenóides, ou entre o nível dos carotenóides nos tecidos ou plasma e a incidência de doenças. Muitos destes estudos tiveram grande contribuição para este assunto. Entretanto, a interpretação destes estudos é difícil por muitas razões. Uma delas é que frutas e também vegetais são misturas complexas de vitaminas, minerais, fibras e outros fitoquímicos. Outro motivo para a difícil interpretação destes estudos é que indivíduos que consomem mais frutas e vegetais, consomem também menos gordura, possuindo então uma consciência do que é uma alimentação saudável (Mayne, 1996).

Muitos dos estudos em que se suplementavam carotenóides à dieta dos participantes foram realizados utilizando-se o β -caroteno. Uma das razões para isto, é que ele é um dos carotenóides mais disponíveis na forma de suplementos comerciais e porque até então já existiam dados mostrando a baixa toxicidade de suas doses farmacológicas em humanos. Estudos realizados na China com β -caroteno mostraram uma diminuição nos casos de câncer gástrico e de esôfago. Triagens no Canadá mostraram redução nos casos de câncer de mama (Mayne, 1996).

Em certas regiões da China como Linxian, há uma grande incidência de câncer de esôfago e gástrico. Nesta população, o nível plasmático de vários micronutrientes como retinol, β -caroteno, riboflavina, vitaminas C e E são extremamente baixos. Um estudo realizado com 3000 homens e mulheres desta região, cuja idade variava entre 40 a 69 anos, foi realizado para verificar se ocorreria uma diminuição destes tipos de câncer com uma combinação de nutrientes. Os nutrientes utilizados foram: retinol e zinco, riboflavina e niacina, ácido ascórbico e molibdênio e também uma combinação de β -caroteno, selênio e α -tocoferol. Após 5 anos, aqueles que tinham tomado a combinação de β -caroteno, vitamina E e selênio apresentaram uma redução de 13% em mortes por

câncer, 4% de redução em morte por câncer do esôfago e também 21% de redução nos casos de câncer gástrico; as outras combinações não levaram a efeitos significativos na redução de câncer neste estudo (Mayne, 1996).

Outros estudos sugeriam que uma dieta com muitas frutas e verduras estava associada a uma diminuição do risco de se ter câncer colorretal. Uma triagem com 864 pacientes, que possuíam adenoma ou que o haviam removido nos meses anteriores, participaram deste estudo no qual recebiam suplementação de β -caroteno (20 mg/dia) e uma combinação de vitamina C (400 mg) e vitamina E (400 IU); entretanto, não houve evidência de que estes componentes diminuíssem a incidência de adenomas (Mayne, 1996).

Na triagem realizada no Canadá com 678 mulheres com câncer no seio e que consumiam altas quantidades de gordura e baixas quantidades de β -caroteno e vitamina C antes do diagnóstico, verificou-se um aumento no risco de morte por este tipo de câncer (Mayne, 1996).

Mais dois estudos podem ser aqui mencionados, mostrando o desempenho do β -caroteno e dos carotenóides na prevenção de câncer cervical. Cinquenta mulheres com câncer cervical invasivo ou carcinoma *in situ* foram monitoradas. Verificou-se que o risco de se ter câncer cervical foi significativamente maior entre mulheres com baixos níveis de carotenóides como α -caroteno e β -caroteno. Numa segunda triagem deste estudo que teve a participação de 30 mulheres com displasia cervical, estas, receberam suplementação de β -caroteno (30 mg/dia) por 6 meses. Depois deste período, 70% das mulheres mostraram biópsia negativa e após 1 ano (6 meses sem a suplementação), 30% continuaram respondendo (Mayne, 1996). Em recente estudo verificou-se que em indivíduos com níveis plasmáticos de *trans* e *cis* licopeno mais elevados ocorre uma redução no tempo de remoção de infecção oncogênica por papilomavírus humano (HPV) (Sedjo e col., 2003). As concentrações plasmáticas de α -caroteno e de β -caroteno também estão conectadas a tecidos cervicais normais (lesões neste tecido podem levar a câncer cervical). Isto foi verificado em um estudo apenas com mulheres mostrando uma ligação entre a atividade pró-vitamina A dos carotenóides e o câncer cervical *in vivo* (Gamboa-Pinto e col., 1998).

Uma grande polêmica em relação aos estudos de β -caroteno surgiu há dez anos com os resultados do "The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene (ATBC) Cancer Prevention Study", uma triagem de intervenção clínica que indicou uma tendência de aumento na incidência de câncer no pulmão em fumantes finlandeses para os quais foram dados β -caroteno como agente preventivo (Heinonen & Albanes, 1994). Uma outra triagem confirmou este resultado: "The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial", CARET, realizado nos EUA indicou que tanto o β -caroteno quanto o retinol levaram a um aumento na incidência de câncer em pulmão de fumantes; dentre os voluntários deste estudo estavam também ex-fumantes e trabalhadores de minas de asbesto (Omenn e col., 1996a). Em estudo recente (Männistö e col., 2004), o β -caroteno presente em níveis normais na dieta não levou a nenhum aumento na incidência de câncer pulmonar nos indivíduos.

O ATBC utilizou 29.133 homens finlandeses fumantes com idade entre 50 a 69 anos que foram divididos em 4 grupos. Um deles recebeu apenas α -tocoferol (50 mg/dia), outro grupo apenas β -caroteno (20 mg/dia) o outro uma combinação de α -tocoferol e β -caroteno; o quarto grupo era o controle. Estas pessoas foram monitoradas durante um período de 5 a 8 anos. Não se verificou diminuição do nível de câncer pulmonar no grupo que recebeu apenas α -tocoferol, porém entre os homens que receberam β -caroteno, observou-se um aumento na incidência de câncer no pulmão em 18%.

Após o término do estudo, o índice de mortalidade por câncer de pulmão nestes indivíduos também foi elevado em 8%, pois ocorreram mortes por câncer e também doenças cardíacas. A figura 1.6 mostra os resultados após 7,5 anos (não foi verificada nenhuma evidência de interação entre β -caroteno e α -tocoferol, no que diz respeito a um aumento no câncer de pulmão (Heinonen & Albanes, 1994).

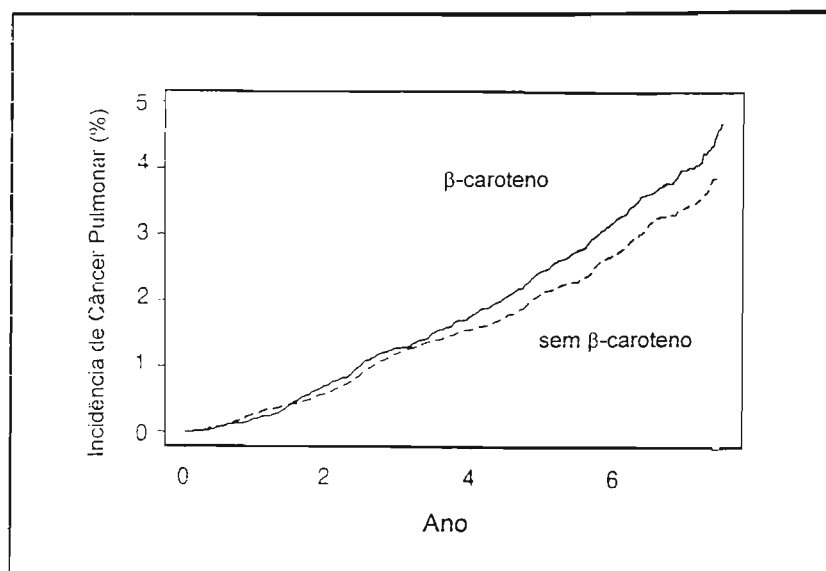


Fig. 1.6: Evidência cumulativa de câncer no pulmão entre participantes que receberam β -caroteno e placebo (sem β -caroteno).

Um outro estudo confirmou estes resultados; “The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET) (Omenn e col., 1996a) realizado nos EUA no qual tanto o β -caroteno quanto o retinol levaram a um aumento na incidência de câncer no pulmão em fumantes (Mayne, 1996).

O CARET acompanhou 18.314 fumantes, ex-fumantes e trabalhadores que foram expostos a minas de asbestos (substância que também se acumula no pulmão). A eles foram administradas 30 mg/dia de β -caroteno e 25000 IU/ dia de retinol (vit. A) na forma de retinil palmitato. Num total, foram monitorados 73.135 pessoas por ano. Os resultados indicaram um aumento de 28% no risco de câncer no pulmão quando comparado ao placebo. No grupo em que houve um tratamento ativo, o número de mortes por câncer teve um aumento de 17%. Devido a estes resultados, o estudo foi finalizado 21 meses antes, porém as pessoas que participaram dos estudos foram monitoradas por mais 5 anos (Omenn e col., 1996a; Omenn e col., 1996b).

1.3.9- β -Caroteno e seus metabólitos

Apesar de todos os estudos apontando o β -caroteno como antioxidante, triagens clínicas em que indivíduos fumantes foram suplementados com β -caroteno, mostraram uma possível ação pró-oxidante deste carotenóide. Após um longo período, verificou-se um aumento na incidência e mortalidade por câncer pulmonar nos fumantes suplementados com β -caroteno (Heinonen & Albanes 1994, Omenn e col., 1996a). Assim a atividade antioxidante e anticarcinogênica do β -caroteno está sendo reexaminada (Yeh & Hu, 2000; Yeh & Hu, 2001). Um estudo em timócitos normais e de tumor mostraram que o β -caroteno é um antioxidante a baixas pressões de oxigênio e pró-oxidante a altas pressões de oxigênio, além disso foi verificado que este carotenóide aumenta o nível de lipoperoxidação por NO_2 (Palozza e col., 1997, Khopde e col., 1998). β -Caroteno e o retinal também levaram a formação de hidroperóxidos lipídicos do metil linoleato (Haila e col., 2000).

Muito da atividade pró-oxidante do β -caroteno está sendo atribuída ao seus metabólitos (Paolini e col., 1999, Paolini e col., 2001; Perocco e col., 1999; Salgo e col., 1999). Seus produtos de oxidação podem induzir a carcinogênese via reação direta com o DNA ou ainda pelos seus metabólitos formados pela ação das enzimas do citocromo P450 (Wang & Russell, 1999).

A formação de metabólitos do β -caroteno foi demonstrada por Wang e col. (1999) em furões expostos à fumaça de cigarro. Este trabalho mostra o aumento da concentração do nível pulmonar de β -caroteno nos animais suplementados e sua drástica redução naqueles expostos à fumaça de cigarro. Mostra ainda um aumento significativo de apo-carotenais no pulmão dos animais expostos à fumaça, provavelmente devido à clivagem excêntrica do β -caroteno (vide esquema 1.5) (Wang e col., 1999). Liu e col. (2004a), também utilizando furões expostos à fumaça de cigarro, verificaram que α -tocoferol e ácido ascórbico podem agir sinergisticamente prevenindo o aumento da oxidação do β -caroteno pela clivagem excêntrica induzida pela exposição à fumaça, facilitando assim a conversão do β -caroteno em ácido retinóico e retinal. Recentemente, o mesmo grupo verificou que furões suplementados com baixas doses de β -caroteno tiveram atenuada a fosforilação da quinase Jun *N*-terminal (JNK), e das proteínas

p38 e p53 em pulmão de furões expostos à fumaça (Liu e col., 2004b). Em doses mais elevadas do carotenóide, houve aumento da fosforilação destas proteínas (Liu e col. 2004b).

Salgo e colaboradores (1999) verificaram o aumento da ligação de metabólitos do benzopireno ao DNA em microsomas de fígado de rato por produtos de oxidação do β -caroteno. Neste estudo, uma mistura de β -caroteno oxidado foi incorporada a membranas de microsomas verificando-se um aumento da ligação do benzopireno tritiado ao DNA; já o β -caroteno não oxidado mostrou uma redução nesta ligação. Recentemente, Kleinjans e col. (2004) não verificaram aumento da formação de adutos em DNA de esperma de salmão induzido por benzopireno em sistema gerador de NADPH pelo β -caroteno e seus produtos de oxidação.

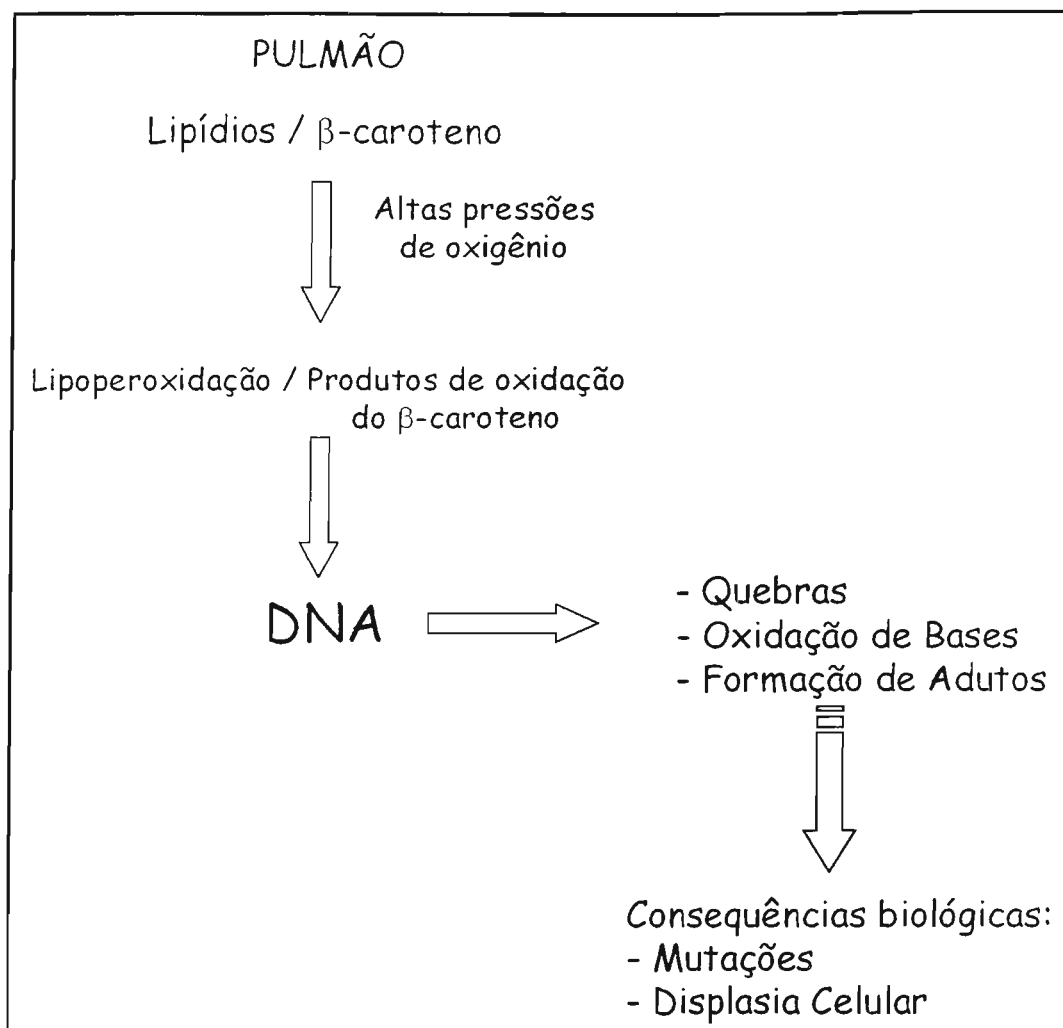
Sabe-se também que o β -apo-8'-carotenal, um produto da clivagem excêntrica do β -caroteno, é um forte indutor das enzimas do citocromo P450 (Gradelet e col., 1996). Em outro trabalho foi observado o aumento na atividade das enzimas do metabolismo de compostos carcinogênicos (citocromo P450) em pulmões de ratos suplementados com altas doses de β -caroteno; entretanto ainda não se sabe se este efeito é devido ao β -caroteno ou a seus metabólitos (Paolini e col., 1999).

A literatura relata, que em concentração excessiva, alguns produtos da clivagem do β -caroteno como o retinol e retinal induzem danos oxidativos em DNA via geração de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Murata & Kawanishi, 2000). Sugere-se que danos oxidativos em DNA podem ser responsáveis pela iniciação e/ou promoção/progressão de tumores em carcinogênese. Em estudos onde foram utilizadas quantidades excessivas de β -caroteno, sugere-se que tanto o retinol como o retinal possuem importante papel no processo de carcinogênese. Este trabalho menciona também que derivados da vitamina A como β -ionona e mesmo o β -caroteno induzem danos em DNA, incluindo 8-oxodGuo na presença de Cobre (II), entretanto os danos são bem menores que aqueles verificados pela ação do retinol e do retinal (Murata & Kawanishi, 2000). Yeh e col. (2003) mostram que DNA de timo de bezerro exposto ao β -caroteno auto-oxidado leva a um aumento na formação da 8-oxodGuo. Novamente, a indução de 8-oxodGuo por β -caroteno

e seus produtos de oxidação não foi verificada em frações microsossomais S9 de fumantes e não-fumantes e também por fenobarbital e benzoflavona. (Kleinjans e col., 2004).

Estudos mostraram que tanto o β -caroteno quanto o licopeno oxidados levam ao aumento de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dGuo) em fibroblastos humanos de prepúcio e em DNA de timo de bezerro (Yeh & Hu, 2001). Foi verificada também a interação do β -caroteno com fumaça de cigarro em células epiteliais de brônquios humanos. Neste estudo constatou-se também a diminuição do carotenóide e o aumento de seus produtos oxidados, como 4-nitro- β -caroteno, β -apo-carotenais e epóxidos do β -caroteno (Arora e col., 2001). Vale ressaltar que Baker e col. (1999) verificaram que o β -caroteno pode reagir com oxidantes da fumaça de cigarro. Um estudo muito interessante mostrou a diminuição do nível plasmático de β -caroteno entre mulheres não fumantes mas casadas com fumantes (Farchi e col., 2001).

Na presença de β -caroteno, a fumaça pode agir como agente de transformação celular em tratamentos agudos e crônicos (Perocco e col., 1999). O aumento da atividade de transformação celular pode ser devido a ativação do β -caroteno pelas enzimas do citocromo P450 (Perocco e col., 1999). A exposição à fumaça de cigarro e/ou a suplementação com doses farmacológicas de β -caroteno levaram a indução no nível destas enzimas (CYP1A1 e CYP1A2) em tecidos pulmonares de furões (Liu e col., 2003). Hurst e col. (2004) demonstraram que o β -caroteno e o licopeno são oxidados na presença de fumaça de cigarro, assim a formação de seus produtos de oxidação pode ter aumentado o número de compostos químicos capazes de reagirem com bases do DNA, contribuindo para o mecanismo carcinogênico verificado nos estudos epidemiológicos. Palozza e col., (2004) verificaram a ocorrência de um aumento no nível de 8-oxodGuo em células de diferentes linhagens tratadas com alcatrão; na presença de β -caroteno o efeito foi mais pronunciado. O esquema 1.8 mostra um resumo do possível mecanismo de ação do β -caroteno como agente pró-carcinogênico:



Esquema 1.8: Possível mecanismo da ação pró-carcinogênica do β -caroteno

1.3.10 – β -caroteno: possíveis explicações para seu mecanismo de ação pró-oxidante

A atividade biológica do β -caroteno sugere sua proteção contra câncer por apresentar uma atividade antioxidante, sendo capaz de capturar radicais livres que podem por sua vez levar ao câncer e demais doenças. Além disso, inúmeros estudos epidemiológicos indicam que pessoas com altos níveis de β -caroteno na dieta e no sangue possuem menores riscos de câncer (Nowak, 1994). Entretanto, as triagens realizadas com fumantes (ATBC e CARET) que levaram ao aumento

na carcinogênese de pulmão pela suplementação com β -caroteno são difíceis de serem explicadas. Este efeito pode ser devido apenas ao β -caroteno, aos seus metabólitos ou ainda a um diferente metabolismo do β -caroteno no pulmão de fumantes se comparado aos não fumantes. Este resultado alarmante é também difícil de entender pois a ingestão de grandes quantidades de β -caroteno em pacientes que apresentam doenças na pele não levaram a nenhum efeito tóxico. (Wang & Russell, 1999).

A tumorigênese do pulmão é complexa e envolve mutações múltiplas no genoma da célula tumoral. Como que as células do epitélio pulmonar podem escapar do controle proliferativo e se tornarem um tumor maligno quando exposta ao β -caroteno e à fumaça? Pode ser possível que o metabolismo do β -caroteno seja alterado, resultando num aumento de sua forma oxidada ou de seus metabólitos oxidados que podem lesar diretamente o DNA ou promover um ambiente para a carcinogênese (Palozza, 1998).

Em resumo, β -caroteno e outros carotenóides possuem atividade antioxidante. Entretanto, sua capacidade é variável e dependente do sistema *in vitro* utilizado. A atividade pró-oxidante depende de fatores como pressão de oxigênio e concentração do carotenóide (Paiva & Russell, 1999; Liu e col., 2004b).

1.4- Breves considerações sobre Fumaça de Cigarro

Radicais livres são conhecidos por causar danos oxidativos a um grande número de diferentes moléculas presentes nas células, incluindo membranas lipídicas, proteínas, carboidratos e DNA (Halliwell, 1987). A fumaça de cigarro é uma mistura complexa de mais de 4700 constituintes (Rahman & Mac Nee, 1996). Uma grande quantidade de radicais livres e espécies reativas de oxigênio são produzidas durante o fumo do cigarro (Park e col., 1998).

A fumaça de cigarro consiste de duas fases: uma gasosa e uma particulada. A fase particulada contém compostos carcinogênicos como catecol, acroleína e hidroquinona, que são capazes de se auto-oxidarem produzindo semiquinonas e radicais hidroxila (Gopalakrishna e col., 1994; Pryor e col., 1998; Stringer e col., 2004). A fase gasosa da fumaça contém principalmente oxidantes

de vida curta como o ânion superóxido e óxido nítrico e aldeídos reativos (Zang e col., 1995; Pryor & Stone, 1993; Church & Pryor, 1985; Stringer e col., 2004). O monóxido de carbono que é conhecido por causar estresse oxidativo de maneira similar ao óxido nítrico também é produzido na queima do cigarro. As concentrações de radicais no condensado da fumaça de cigarro são mantidas por um tempo considerável pelas reações redox, apesar de seu tempo de vida curto (Park e col., 1998).

A fumaça de cigarro é associada a muitas doenças crônicas pulmonares, doenças crônicas degenerativas e doenças cardiovasculares variando de inflamações ao câncer, além de ser também apontada como um dos fatores para o desenvolvimento de anormalidades em outros órgãos. A fumaça pode causar peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, aumento de quebras em DNA e formação de 8-oxodGuo (Church & Pryor, 1985; Pryor & Stone, 1993; Leanderson & Tagesson, 1992; De Flora e col., 2003).

O plasma de fumantes possui um baixo nível de ácido ascórbico e o fluido epitelial de fumantes mostra uma diminuição no nível de vitamina E, que pode ser devido ao aumento do consumo destes oxidantes pelos fumantes. Além disso, a exposição de plasma humano à fumaça resulta em uma depleção de antioxidantes como o ácido ascórbico e a bilirubina (Pacht e col., 1986; Park e col., 1998).

O pulmão humano é dotado com um elaborado sistema antioxidante, já que é exposto a oxidantes do meio ambiente (Comhair & Erzurum, 2002; Stringer e col., 2004). Dentre os compostos biologicamente importantes, tem-se as enzimas superóxido dismutase como, MnSOD e CuZnSOD. Estas enzimas são particularmente importantes já que representam a primeira linha de enzimas antioxidantes de defesa contra espécies reativas de oxigênio (Zelko e col., 2002; Kinnula & Crapo, 2003; Stringer e col., 2004).

A exposição de pulmões à fumaça de cigarro aumenta o nível de citocinas inflamatórias (Qiu e col., 2003). Recentemente, Stringer e col., (2004) verificaram um aumento no nível de MnSOD, em animais expostos à fase particulada da fumaça de cigarro.

Objetivos

2- OBJETIVOS

Tem sido amplamente investigado o papel de eteno adutos em processos mutagênicos e carcinogênicos induzidos por agentes químicos ocupacionais ou presentes no ambiente assim como por compostos formados endogenamente. Algumas dessas lesões acumulam-se no DNA após exposição crônica ao carcinógeno e levam à incorporação errada de bases após a replicação ou a transcrição. A oxidação do β -caroteno leva à formação de produtos reativos como epóxidos, aldeídos, cetonas, que são capazes de reagir com o grupamento amina de bases de DNA.

O presente estudo visa investigar a formação de eteno adutos em nucleosídeos, DNA e células expostas ao β -caroteno e seus produtos de oxidação. Este trabalho também tem como objetivo verificar a possível associação entre a exposição à fumaça de cigarro e suplementação com β -caroteno na promoção de danos ao DNA, em experimentos *in vivo*.

Materials e Métodos

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Reagentes

A seguir está apresentada uma lista contendo todos os reagentes utilizados:

Merck: (Darmstadt, Alemanha) Hidróxido de sódio, fosfato de potássio monobásico, 2'-desoxiguanosina, éter etílico, clorofórmio, acetato de etila, ácido fórmico, hidróxido de sódio, fosfato de potássio monobásico, sulfato de magnésio, ácido fosfórico, sacarose, cloreto de magnésio.

Millipore: Ultrafree -Mc (10000MNWL filter unit), Ultrafree-Mc filter unit (poro 0,22 μm).

Em Science: (Darmstadt, Alemanha) metanol, acetonitrila, isopropanol.

Cinética Química: (São Paulo, Brasil) Clorofórmio e etanol (P.A).

Sigma: (St. Louis, EUA) Desferroxamina, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, sulfato de estreptomicina, cloreto de potássio fosfato de sódio dibásico e monobásico, tripsina, ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), dodecil sulfato de sódio (SDS), clorofórmio, retinal, β -apo-8'-carotenal, β -caroteno, carbonato de sódio, L-glutamina, Tween 80, nuclease P1, meio Eagle modificado por Dulbecco (DME), corante (*Lucifer Yellow CH*).

Pharmacia Biotech: (Uppsala, Suécia): Fosfatase alcalina.

Mallinckrodt Chemical: (Paris, França): Carbonato de sódio anidro

Fluka Chemika: (Buchs, Suíça). Peróxido de Hidrogênio

Cultilab: (Campinas, Brasil): soro fetal bovino, penicilina

BASF: (Ludwigshafen, Alemanha) zeaxantina

3.2- Equipamentos

Espectrofotômetro Hitachi U300 (Tokyo, Japão).

Centrífuga refrigerada Hitachi, modelo SCR 20B (Tokyo, Japão).

Centrífuga refrigerada da Eppendorf modelo S402 e 5043 (Hamburgo, Alemanha).

Centrífuga não refrigerada da Eppendorf, modelo 5415C (Hamburgo, Alemanha).

Estufa de CO₂ Napco®, modelo 5100 Precision Scientific (Chicago, EUA).

Autoclave vertical modelo 415, FANEM (São Paulo, Brasil).

Liofilizador: Micromódulo E-C para secagem a baixas temperaturas acoplado à bomba de vácuo Savant, modelo VLP200 (Hollbrook, EUA) e um concentrador modelo 5301 da Eppendorf (Hamburgo, Alemanha).

Bomba peristáltica: Pharmacia, modelo LKB - Pump P-1 (Uppsala, Suécia).

Microscópio invertido Diaphot 300, Nikkon (Tokyo, Japão).

Agitadores: Orbital Incubator Shaker, Gyromax Tm 703, Amerex Instruments (Lafayette, EUA), e Thermomixer comfort, Eppendorf (Hamburgo, Alemanha).

pH-metro Corning modelo 320 Sigma (St. Louis, EUA).

Balança analítica A&D Company (Tokyo, Japão).

Purificador de água: Milli-Q.

3.2.1 - Espectrômetro de massa (MS)

Espectrômetro de Massa: Quattro II Micromass, (Manchester, UK) fonte de ionização por spray de elétrons (ESI) e software Masslynx.

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa operando com ionização por spray de elétrons (*electrospray*) no modo positivo foi feita utilizando-se um espectrômetro de massa com triplo quadrupolo Quattro II da Micromass e um sistema de HPLC da Shimadzu (Kyoto, Japão) incluindo três bombas LC-10 AD/VP, um injetor Rheodyne (Cotati, EUA), um injetor automático, modelo SIL-10 AD/VP e um detector de absorvância, modelo SPD-10 AV/VP, controlados por um módulo de comunicação SCL-10AVP e os *softwares* Class-VP ou MassLynx, este último da Micromass.

3.2.2 – Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC)

Aparelhos de HPLC utilizados:

(1) Aparelho composto de 2 bombas Shimadzu, LC-6AD, um injetor Rheodyne, detector de fotodiodos SPD-M10V/VP, um injetor automático, modelo SIL 10AD/VP, todos estes componentes controlados por uma SCL-10AVP e software

CLASS-VP versão 5.02 também da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto-Japan), interfaciados a um computador.

(2) Aparelho composto por bombas Shimadzu LC-10AD, um injetor Rheodyne, detector de absorvância UV, SPD-10A e um detector coulométrico Coulochem II ESA cela analítica modelo 5010. O controlador utilizado foi um "Communication Bus Module CBM-10A e software CLASS LC-10AD da Shimadzu (Kyoto, Japan) interfaciado a um computador.

(3) Aparelho composto por 2 bombas Merck – Hitachi L-7100 (Darmstadt, Alemanha), um injetor Rheodyne, detector de fotodiodos em série HP-Series 1100 acoplados a um computador. Os cromatogramas foram adquiridos utilizando-se o Software HP-chem .

Foram utilizadas as seguintes colunas cromatográficas de fase reversa:

1- C18 (250 x 4,6 mm i.d., tamanho da partícula 5 μ m), Phenomenex (Torrance, EUA).

2- C18 (250 x 10 mm i.d., 10 μ m), Phenomenex (Torrance, EUA).

3- Luna C18 (150 mm x 2,0 mm i.d., 3 μ m), Phenomenex, (Torrance, EUA).

4- Phenosphere-next (150 x 2 mm x 3 μ m), Phenomenex, (Torrance, EUA).

5- Lichrosphere RP-18 (250 x 4,6 mm i.d., 15 μ m), Merck (Darmstadt, Alemanha).

Pré-colunas: Phenomenex C18 (ODS, Octadecil) (4mm x 3.0mm ID) (Torrance, EUA).

As colunas e os métodos utilizados foram padronizados, para cada situação analítica.

As seringas utilizadas são da marca Hamilton (Nevada, EUA) e de volumes: 50 μ l, 100 μ l, 250 μ l e 500 μ l.

Os sistemas desenvolvidos nas análises por cromatografia em fase reversa para a verificação da formação de adutos de DNA, quantificação de dGuo e de 8-oxodGuo nas amostras biológicas, oxidação de carotenóides, entre outros, estão descritos a seguir:

Sistema 1: Coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) e Coluna C-18 (250 x 10 mm, 10 μ m, semi preparativa)

Fluxo: 1mL/min e 4,6 ml/min para a outra coluna

Solventes: gradiente água/metanol

0-5 min: 2% MeOH ---- 5% MeOH

5-20: 5% MeOH ----- 30% MeOH

20-25 min: 30% MeOH ---- 100% MeOH

25-40 min: 100% MeOH

40-45 min: 100% MeOH ---- 2% MeOH

Sistema 2: Coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m)

Fluxo: 1mL/min Método isocrático

Solvente: água/metanol 20% durante 30 min.

Sistema 3: Coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m)

Fluxo: 1mL/min Método: gradiente

Solvente: água/acetonitrila (ACN)

0 – 30 min: água/ 8 % ACN ----- água /16 % ACN

Sistema 4: Coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m)

Fluxo: 1mL/min Método isocrático

Solvente:Tampão KH_2PO_4 50 mM pH 5.5 / 6% Metanol durante 45 min.

Sistema 5: Coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m)

Fluxo: 1mL/min Método isocrático

Solvente:Tampão KH_2PO_4 50 mM pH 5.5 / 8% Metanol durante 45 min.

Sistema 6: Coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m)

Fluxo: 1 mL/min

Solvente: 68% ACN / 22% THF / 10% MeOH / 0,025% NH_4Ac

Modo isocrático; tempo da corrida: 20 minutos

Sistema 7: Coluna: Lichrosphere RP-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)

Fluxo: 0,8 ml/min

Gradiente de Solventes

Solvente A (75% ACN / 15% MeOH / 10% H₂O)

Solvente B: (70% MeOH / 30% Acetato de etila)

0 – 10 min: 100 % solvente A ---- 100 % solvente B

10-20 min: 100 % solvente B

20 – 25 min: 100% solvente B ----- 100% solvente A

25 – 30 min 100% solvente A

3.2.3- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os produtos coletados foram liofilizados e então, ressuspensos em DMSO. O espectro de RMN¹H, foi obtido em um espectrômetro DRX-500 MHz (Bruker, EUA) a 27°C. Os espectros foram registrados sem ou com supressão do pico da água.

3.2.4- Equipamento utilizado na análise da comunicação celular após o tratamento com β-caroteno e zeaxantina oxidados

Para o ensaio de comunicação intercelular via junções comunicantes foi utilizado um sistema contendo um micromanipulador e um microinjector Eppendorf (Hamburgo, Alemanha). As imagens foram verificadas utilizando-se um microscópio fluorescente Zeiss Axiovert 100 TV acoplado a uma câmera CCD (ORCA II, Hamamatsu).

3.3 – Verificação da formação de produtos da reação entre 2'-desoxiguanosina (dGuo) e retinal

3.3.1- Reação entre dGuo e retinal na presença de peróxido de hidrogênio

Dissolveu-se 100 mg (0,35 mmol) de retinal em 25 ml de acetonitrila e 50 mg (0,185 mmol) de dGuo em 25 ml de tampão carbonato 200 mM pH 9,4.

Adicionou-se a este sistema de peróxido de hidrogênio (50 mM). Esta reação é feita no escuro desde a pesagem do retinal até a adição dos reagentes pois o retinal se oxida sob a luz e o peróxido também pode se decompor. A incubação foi deixada por 7 dias a temperatura de 50 °C sob agitação. O aldeído foi removido extraindo-se a fase aquosa com acetato de etila (AcOEt). Alíquotas da fase aquosa foram injetadas no HPLC utilizando-se o Sistema 1. Os controles contendo também foram incubados nas mesmas condições. Os produtos formados foram coletados, liofilizados e depois levados ao espectrômetro de massa para análise.

3.3.2- Obtenção dos espectros de massa (LC/ESI/MS) dos produtos da reação entre retinal e dGuo

Os espectros de massa foram obtidos com ionização por spray de elétrons no modo positivo em um espectrômetro com triplo quadrupolo Quattro II da Micromass acoplado a um sistema de HPLC da Shimadzu (Kyoto, Japão) (vide item 3.2.1) controlados por um módulo de comunicação SCL-10A/VP. O eluente utilizado foi uma mistura de água e acetonitrila (30%) bombeado através de uma coluna analítica C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm). Após o detector de absorvância ($\lambda = 254$ nm) foi conectado um divisor de fluxo (*splitter*) de modo a permitir que 250 µL da fase móvel entrasse no espectrômetro de massa e 750 µL passasse fosse descartado. Foi utilizado o intervalo de relação massa/carga (m/z) de 100 a 600 Da para obtenção dos espectros em MS_1 com diferentes voltagens de cone (10V, 20V, 35V e 50V). A pressão do gás de colisão (argônio) utilizada foi de $6,7 \times 10^{-7}$ mbar e a energia de colisão de 10 eV; a temperatura da fonte foi mantida em 100 °C. Nas amostras adicionou-se 0,2% de ácido fórmico para facilitar a ionização.

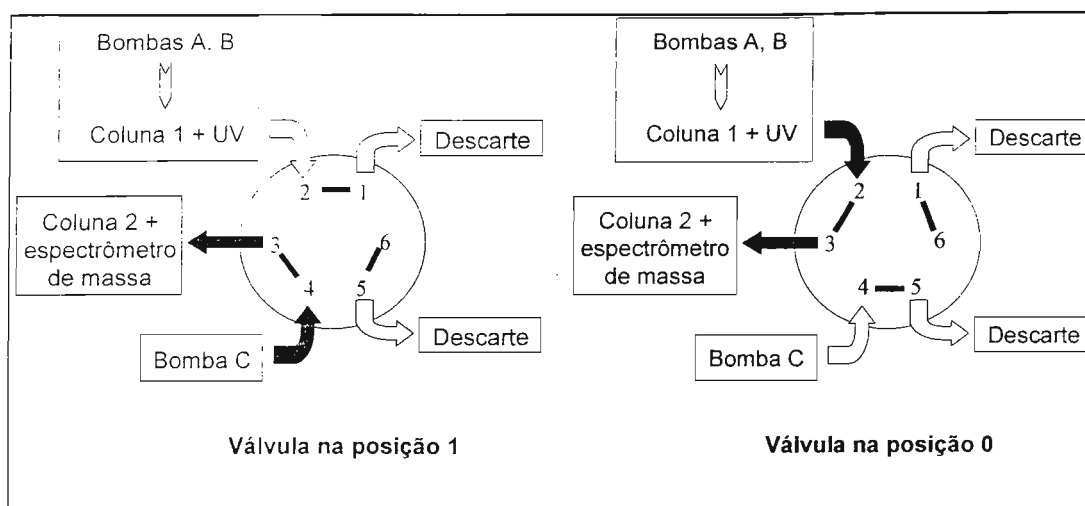
3.4- Desenvolvimento, padronização e validação de metodologia para a detecção sensível do 1, N²-εdGuo LC/ESI/MS-MS em sistemas biológicos

3.4.1- Organização do sistema

Foi utilizado o equipamento descrito no item 3.2.1. O sistema era composto também por uma válvula direcionadora de fluxo, modelo FCV-12AH (Kyoto, Japão).

Para evitarmos a pré-purificação por HPLC que acarretava possibilidade de contaminação, foi desenvolvido um sistema em que as amostras poderiam ser injetadas diretamente no espectrômetro de massa. Para isto, foi utilizada uma válvula direcionadora de fase móvel proveniente das diferentes bombas do sistema.

No início da análise, a válvula controlada pelo HPLC, é mantida em sua posição 1; esta permite que a amostra seja eluída pela coluna, com o solvente proveniente das duas bombas do HPLC (bombas A e B), a amostra eluída contendo constituintes que não deveriam ir para o espectrômetro de massa, nucleosídeos provenientes da hidrólise do DNA e detectados no UV, é enviada ao descarte. Ao mesmo tempo, a bomba C bombeia fluxo de solvente para o espectrômetro de massa passando por uma outra coluna (capilar). Após o último nucleosídeo, quando o aduto de nosso interesse é eluído pelo sistema de HPLC, a válvula é trocada de posição, agora para a posição 0; fechando o sistema. Agora, o composto de interesse é enviado para a outra coluna que está conectada ao espectrômetro de massa onde será detectado. Quem comanda o fluxo de solvente quando a válvula está na posição 0 é o HPLC, e o fluxo bombeado pela bomba C é descartado. Após um tempo pré-determinado, a válvula retorna à posição 1. O esquema 3.1 ilustra o sistema montado.



Esquema. 3.1: Esquema da válvula direcionadora de fluxos em suas duas posições.

3.4.2- Condições cromatográficas (HPLC) e condições de detecção no espectrômetro de massa do $1,N^2$ - ϵ dGuo nos sistemas modelo e em amostras biológicas

Coluna analítica C18 (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μ m, Phenomenex) foi eluída com uma fase móvel constituída por 8 % de ACN em água contendo 0,1 % de ácido fórmico até 18 min. De 18 a 19 min, a concentração aumentou para 50 % de ACN e permaneceu nesta condição até 38 min. De 38 a 39 min, voltou a sua concentração inicial de 8 % até 50 min. Foi feito também um gradiente de fluxo mantido pelas bombas A e B. O fluxo inicial foi de 0,4 ml/min até 18 min. De 18 a 19 min o fluxo diminuiu para 0,2 ml/min e novamente de 19 a 19,5 min para 0,1 ml/min. A partir de 32 até 32,5 minutos o fluxo caiu de 0,1 para 0,05 ml/min (50 μ L/min). De 35 a 36 min o fluxo foi aumentado para 0,4 ml/min, e assim permaneceu até o final da corrida. Uma segunda coluna Phenosphere-next (150 x 2 mm x 3 μ m), foi simultaneamente eluída com uma fase móvel constituída por 50% água contendo 0,1% de ácido fórmico / 50 % ACN a um fluxo de 50 μ L/min, utilizando-se a bomba C. A válvula permaneceu na posição zero no intervalo de 22 a 34 min para que pudesse ser detectado o $1,N^2$ - ϵ dGuo em 45 min no espectrômetro de massa.

As amostras de DNA hidrolisadas contendo 1 pmol de [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 - ϵ dGuo como padrão interno foram injetadas neste sistema (LC/ESI/MS-MS) pelo modo de monitoramento de reação múltipla (MRM). As transições de razão m/z 292 \rightarrow 176 (1, N^2 - ϵ dGuo) e m/z 297 \rightarrow 181 ([$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 - ϵ dGuo) foram monitoradas a cada 1 s. A voltagem do cone foi mantida em 15 V. A pressão do gás de colisão (argônio) na célula de colisão em $6,7 \times 10^{-7}$ mbar e a energia de colisão em 10 eV. Em ambos os casos, a temperatura da fonte foi mantida em 100 °C e os fluxos dos gases de secagem e nebulização (nitrogênio) foram ajustados para 350 e 10 L/h, respectivamente. O potencial do capilar foi ajustado para 3,10 kV e do eletrodo HV para 0,3 kV. Os dados foram processados com o software MassLynx da Micromass.

3.4.3- Aquisição dos espectros de massa do 1, N^2 - ϵ dGuo e [$^{15}\text{N}_5$]-1, N^2 - ϵ dGuo por LC/ESI/MS-MS

Alíquotas de 200 fmol dos padrões 1, N^2 - ϵ dGuo e [$^{15}\text{N}_5$] - 1, N^2 - ϵ dGuo foram analisadas segundo o sistema mencionado (itens 3.4.1 e 3.4.2). As varreduras em MS_1 e o espectro de massa do íon produzido em MS_2 foram coletados utilizando a variação de 100-400 Da.

3.4.4 – Validação da metodologia da detecção do 1, N^2 -eteno-2'-desoxiguanosina (1, N^2 - ϵ dGuo) por LC/ESI/MS-MS

3.4.4.1- Curva de calibração para a quantificação do 1, N^2 - ϵ dGuo por LC/ESI/MS-MS

Foi realizada a curva de calibração adicionando-se, para cada ponto, quantidades variáveis do padrão o 1, N^2 - ϵ dGuo (5, 20, 50, 100, 300, 700, 1000, 1500, 2500, 5000 fmol) e 1 pmol de padrão de 1, N^2 - ϵ dGuo isotopicamente marcado com nitrogênio 15 para cada ponto. A curva foi realizada plotando-se a razão entre a área do padrão do eteno e a do padrão isotopicamente marcado versus a concentração do aduto (1, N^2 - ϵ dGuo) adicionado.

3.4.4.2- Quantificação do 1,N²-εdGuo por LC/ESI/MS-MS em DNA de timo de bezerro comercial sem incubação

Diferentes quantidades de DNA (20, 50, 75 e 100 µg) foram “contaminadas” com 100, 300, 500 e 1000 fmol de 1,N²-εdGuo. À estas amostras foi adicionado o padrão do eteno aduto isotopicamente marcado, seguindo-se a hidrólise e quantificação do 1,N²-εdGuo por LC/ESI/MS-MS.

3.4.4.3- Quantificação do 1,N²-εdGuo por LC/ESI/MS-MS em DNA de fígado de ratas não tratadas

Amostras de DNA de fígado de ratas *Wistar* não tratadas (11 semanas) (200 µg) foram “contaminadas” com 10, 50, 100 e 500 fmol de 1,N²-εdGuo. Após adição de padrão isotopicamente marcado e sua hidrólise (vide item 3.8), estas foram analisadas por LC/ESI/MS-MS para quantificação do aduto.

3.4.4.4- Quantificação do 1, N²-εdGuo por LC/ESI/MS-MS em DNA de cultura celular sem tratamento

Amostras de DNA de fibroblastos renais de macaco verde africano, linhagem CV1-P (124 µg) foram analisadas por LC/ESI/MS-MS após hidrólise e adição de padrão isotopicamente marcado.

3.5 – Análise da lesão 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) nos sistemas modelos e nas amostras biológicas

Após a hidrólise das amostras (Fiala e col., 1989) de DNA (DNA de timo de bezerro - 50 µg; amostras biológicas - 100 µg), as amostras foram submetidas às análises para quantificação de 8-oxodGuo. A hidrólise foi realizada como descrito no item 3.8. Esta análise foi feita por detecção eletroquímica num sistema de HPLC acoplado a um detector coulométrico Coulochem II ESA. O potencial usado na "guard - cell" foi de 800 mV e na cela analítica foram selecionados os potenciais 130 mV e 280 mV, potencial de oxidação da 8-oxodGuo. A separação foi obtida segundo o Sistema 5 (vide item 3.2.2). Para a obtenção dos resultados foi feita uma curva de calibração de 8-oxodGuo e dGuo.

3.6 – Extração de DNA de amostras biológicas

O DNA foi extraído utilizando-se o mesmo método de Wang e col. (1994). Cada 500 mg de tecido ou 10×10^7 de células foi homogeneizado em 5 mL de tampão A (Sacarose 320 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, desferroxamina 0,1 mM, 1 % de Triton X-100 pH 7,5). Após centrifugação a 1500 g por 10 minutos, o precipitado foi coletado e ressuspenso em 5 mL de tampão A. Após nova centrifugação a 1500 g por 10 minutos, o precipitado foi ressuspenso em 3 mL de tampão B (Tris-HCl 10 mM, EDTA- Na_2 5 mM, desferroxamina 0,15 mM pH 8,0) e 200 µL de uma solução de SDS 10 %. A esta solução foram adicionados 20 µL de uma solução 10 mg/mL de RNase A (preparada em tampão C, Tris-HCl 10 mM, EDTA- Na_2 1 mM, desferroxamina 2,5 mM, pH 7,4) e 2,5 µL de uma solução 20 U/µL de RNase T1 (preparada em tampão C). A amostra foi incubada a 37 °C por 1 h e, em seguida, foram adicionados 180 µL de uma solução 20 mg/mL de proteinase K. Após incubação a 37 °C por 1 h e centrifugação a 5000 g por 15 minutos, o sobrenadante foi coletado, ao qual foram adicionados 2 mL de solução de NaI e 3 mL de isopropanol. O tubo foi mantido no freezer (-20°C) por uma noite para precipitação do DNA. Em seguida foi feita uma centrifugação a 5000 g por 15 minutos, o precipitado foi coletado e lavado com 3 mL de isopropanol 60 % (5000 g, 15 minutos) e 2 mL de etanol 70 % (5000 g, 15 minutos). O DNA foi então

ressuspensão em 500 μ L de solução de desferroxamina (0,1 mM) suficiente para dissolvê-lo e sua concentração e pureza foram determinadas, respectivamente, pela leitura da absorbância a 260 nm e pela relação A_{260}/A_{280} nm.

3.7- Precipitação de DNA de timo de bezerro

Para a precipitação do DNA adicionou-se 100 μ L de acetato de sódio 3 M e 1 mL de etanol 100 % gelado. As soluções foram deixadas para precipitação durante a noite. No dia seguinte, a solução foi agitada e centrifugada por 5 min a 10.000 rpm. Por duas vezes, descartou-se o sobrenadante, a solução foi lavada duas vezes com etanol 70 %. Novamente, descartou-se o sobrenadante, e adicionou-se 500 μ L de solução 0,1 mM de mesilato de desferroxamina. A concentração foi determinada pela leitura da absorbância a 260 nm.

3.8- Hidrólise do DNA de timo de bezerro e de amostras biológicas

Procedeu-se como descrito por Fiala e col. (1989). À 300 μ g de DNA de amostras biológicas (para amostras de DNA de timo de bezerro, foi hidrolisada apenas 200 μ g de DNA, e os demais reagentes adicionados de maneira proporcional) foram adicionados 6 μ L de uma solução 1,0 M de tampão acetato de sódio (pH 5), 4 unidades de nuclease P1 e 15 μ L de padrão interno (1 pmol / 10 μ L) do aduto 1, N^2 - ϵ dGuo marcado isotopicamente com 15 N. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C no escuro, e em seguida, adicionou-se 18 μ L de tampão Tris -HCl 1 M, pH 7,4, 18 μ L de tampão para fosfatase alcalina e 24 U de fosfatase alcalina. Seguiu-se a incubação a 37 °C por 1 h. À amostra, adicionou-se clorofórmio para eliminar as proteínas e em seguida esta foi centrifugada. A fase aquosa foi coletada para análise via LC/ESI/MS-MS.

3.9 – Lesões em 2'-desoxiguanosina (dGuo) e DNA de timo de bezerro induzidas por β -caroteno e seus produtos de oxidação, retinal e β -apo-8'-carotenal

3.9.1 - Incubações de dGuo com carotenóides

Uma solução de dGuo (5 mg, 18 μ mol) dissolvidos em 1000 μ l de tampão fosfato (50mM, pH 7,4), ou tampão carbonato (200 mM, pH 9,4) foram incubadas com retinal (5 mg, 17,5 μ mol), β -apo-8'- carotenal (5 mg, 12 μ mol) ou β - caroteno (5 mg, 9,3 μ mol) em 500 μ l de acetonitrila, na presença ou ausência de peróxido de hidrogênio (50 mM). As amostras foram incubadas durante 72 horas a 37 °C a 1000 rpm. Os carotenóides que não reagiram foram removidos com extrações com acetato de etila ou clorofórmio.

3.9.2- Incubações de DNA de timo de bezerro com carotenóides

A 1,0 mL de uma solução de DNA de timo de bezerro (5 mg/ml), dissolvido em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4), foi adicionada solução de 5 mg de β -caroteno, retinal ou β -apo-8'-carotenal dissolvidos em 0,5 ml de acetonitrila. O efeito do H₂O₂ (50 mM) também foi estudado. As amostras foram incubadas a 37 °C, por 72 horas a 1000 rpm. A mesma incubação foi realizada em tampão carbonato (200 mM, pH 9,4) e novamente em pH 7,4 na presença de mesilato de desferroxamina 0,1 mM. Os carotenóides que não reagiram foram removidos com extrações com acetato de etila ou clorofórmio. Em seguida procedeu-se à precipitação do DNA (vide item 3.7).

3.10 - Lesões em DNA de cultura celular tratada com β -caroteno e seus produtos de oxidação

3.10.1- Cultivo das células

Fibroblastos normais de pulmão humano, linhagem IMR-90 foram cultivados em meio Eagle modificado por Dulbecco (DME) e também

suplementado com NaHCO_3 (1,2 g/L) e 10% de soro fetal bovino (SFB). O meio contém ainda 100 $\mu\text{g/mL}$ de penicilina e 94 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de estreptomicina. As culturas de células foram incubadas em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 a 37°C, no escuro. As células foram repicadas a cada 4 dias e cresceram aderidas à superfície da garrafa plástica utilizada para cultura. Vale ressaltar, que as células da linhagem CV1-P, fibroblastos renais de macaco verde africano, utilizadas na validação do método por LC/ESI/MS-MS (vide item 3.4.4.4) apresentam cultivo semelhante.

3.10.2- Repique das células

Retirou-se o meio com uma bomba de sucção, as células foram lavadas 2 vezes com PBS (tampão fosfato salina - NaCl 137 mM, KCl 1,68 mM, Na_2HPO_4 1,47 mM, pH 7,0). Em seguida adicionou-se 5 mL de solução de tripsina (0,05 % em PBS e 1 mM de EDTA). Retirou-se a tripsina e após desprenderem as células, adicionou-se 10 mL de meio contendo SFB e esta suspensão foi distribuída para novas garrafas onde se fez a diluição desejada.

3.10.3- Viabilidade celular da linhagem IMR 90 frente ao β -caroteno e seus produtos de oxidação

Inicialmente as células da linhagem IMR-90 foram desprendidas das garrafas em que estavam e foram ressuspensas em 20 mL de meio de cultura. Dessa solução, retirou-se 100 μl e adicionou-se mais 400 μl de azul de tripan, que colore apenas as células mortas. Em seguida, uma parte desta solução foi transferida para uma placa de Neubauer (0,0025 mm^2), as células foram contadas, e diluídas até a concentração de $5,0 \times 10^5$ células por mL, com meio de cultura contendo soro fetal bovino.

Foram adicionadas $5,0 \times 10^5$ células em cada poço de uma placa para a realização dos experimentos de viabilidade celular. As células ficaram durante 24 h nesta placa para que aderissem e então foram submetidas ao tratamento com os carotenóides, retinal, β -apo-8'-carotenal, β - caroteno, solubilizados em THF bidestilado nas concentrações: 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM . As células foram

tratadas por 17 h. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com solução de PBS, e foi adicionado 700 μ l de meio de cultura e 300 μ l de solução de MTT (5 mg/ml em PBS). Após 2 h, o meio foi retirado com cuidado para não perder o precipitado formado e adicionou-se 1,0 ml de solução 50 % SDS (10 %) e 50 % dimetilformamida (pH 4,8) a fim de se solubilizar o precipitado. Mediu-se a concentração a 595 nm (Hansen e col., 1989).

3.10.4- Tratamento das células IMR 90 com β -caroteno e seus produtos de oxidação

Células da linhagem IMR 90 foram transferidas para placas com 20 mL de meio contendo soro fetal bovino. Após atingirem aproximadamente 75 % de confluência, estas foram tratadas separadamente com 20 μ M de retinal, β -apo-8'-carotenal e β - caroteno em THF, por 17 horas. A concentração de THF no meio foi de 0,25 %. Os controles com THF e branco também foram realizados. Após este período as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e retiradas das placas adicionando-se 10 mL de meio. Posteriormente, foram centrifugadas a 1500 g por 10 min. O pellet foi recolhido e procedeu-se a extração e hidrólise do DNA (vide itens 3.6 e 3.8).

3.11- Biodisponibilidade do licopeno e do β -caroteno

3.11.1- Administração dos carotenóides

Tanto o licopeno quanto o β -caroteno são substâncias fotossensíveis e portanto foram manipuladas no escuro para minimizar sua oxidação. Foi preparada uma solução estoque tanto de licopeno quanto de β -caroteno. Os carotenóides foram então triturados em Tween 80, à temperatura ambiente, obtendo-se assim uma pasta. Adicionou-se solução salina e a mistura foi homogeneizada em vórtex até se obter uma concentração final de 10 mg/mL de cada carotenóide. Inoculou-se 1,0 mL desta solução nos ratos *Wistar* machos (12 semanas) intraperitonealmente (Forssberg e col., 1958; Matos e col., 2001)

3.11.2- Coleta de sangue dos animais

3.11.2.1 – Método 1 (Canulação dos animais)

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, havendo assim total liberdade de movimentação, para que pudessem ser efetuadas 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 animais que não receberam carotenóides também foram analisadas. Os grupos eram compostos por 6 animais.

3.11.2.2 – Método 2

Os ratos, exceto grupos controle receberam licopeno e β -caroteno. Após 3, 6, 9 e 24 h da inoculação dos carotenóides nos animais, amostras de 1 mL de sangue foram coletadas.

Os animais foram colocados em uma estufa, com a porta aberta, a uma temperatura variável de 36 a 42°C durante 15 minutos sob observação; este procedimento é realizado para 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 para a cauda, ficando assim impossibilitados de se movimentarem. Os animais foram sangrados pela cauda. O tubo de coleta também continha solução salina e heparina 500 U/ml.

3.11.3- Preparo e análise das amostras de sangue

O sangue recolhido foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. O plasma sanguíneo foi coletado. A 250 μ L de plasma foram adicionados 250 μ L de etanol e

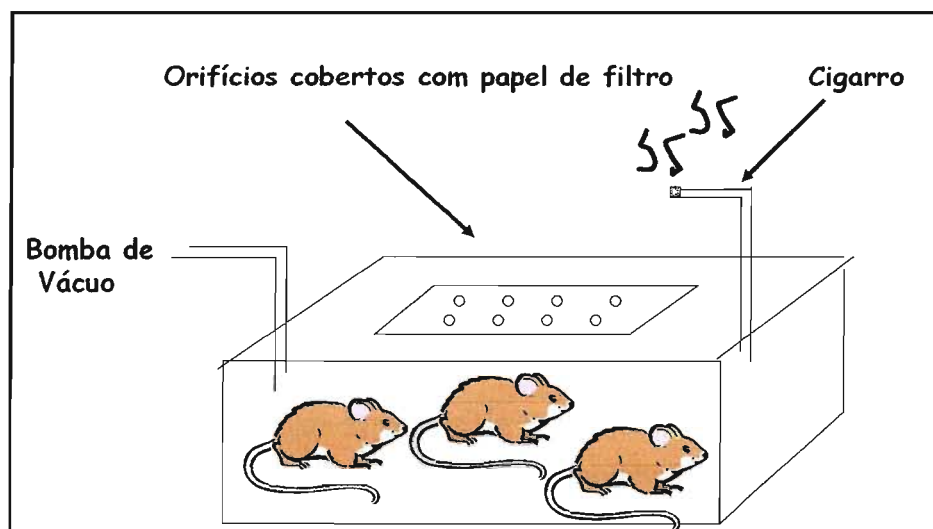
500 μ l de hexano. As amostras foram agitadas por 1 minuto no vórtex e então levadas à centrifuga por 5 minutos a 2500 rpm. Além das proteínas do plasma, foram observadas 2 fases, uma delas bem límpida que foi então removida. Esta fase foi seca sob nitrogênio e em seguida adicionou-se 10 μ L de uma solução 5 mM de β -ionona utilizada como padrão interno e ainda 40 μ L da fase utilizada para injeção no HPLC (68% ACN, 22% THF, 10% MeOH e 0,025% NH_4Ac). Destas alíquotas, 20 μ L foram injetadas no HPLC segundo o item 3.2.2 - sistema 6 (Lowe e col., 1999; Riso e col., 1999).

3.12- Lesões em DNA de animais tratados com fumaça de cigarro e suplementados com β -caroteno

3.12.1- Tratamento por 7 e 30 dias

Ratos *Wistar* (machos) foram suplementados com doses diárias (10 mg/ kg) (Glise e col., 1999; Matos e col., 2001) de solução de β -caroteno intraperitonealmente *i.p.* durante 7 e 30 dias; o peso dos ratos inicialmente era em torno de 300 g. A solução foi preparada macerando o β -caroteno com 1 mL de Tween 80 com a adição de solução salina 0,9% para o término da homogeneização (Matos e col., 2001). Os ratos foram divididos em 5 grupos de 6 animais cada: grupo controle que não recebeu nada; grupo denominado veículo, que recebeu solução salina e tween; grupo que recebeu β -caroteno; grupo que foi exposto à fumaça de cigarro (marca comercial); e grupo que recebeu β -caroteno e foi exposto à fumaça de cigarro. A exposição dos ratos foi feita dentro de uma caixa (50 cm x 30 cm x 16 cm) com tampa de acrílico e furos, estes cobertos com papel de filtro para facilitar a respiração dos animais. A caixa continha ainda mais dois furos, um onde o cano da bomba de vácuo foi conectado e outro onde foi conectada uma pequena mangueira, na qual colocou-se o cigarro (Adaptado de Park e col., 1998). A caixa foi vedada com fita adesiva para evitar perda da fumaça dos cigarros. Os ratos foram expostos à fumaça, duas vezes ao dia, às 9 h e às 15 h. Aproximadamente 5,5 cm de cada cigarro foi queimado num total de 6 cigarros por grupo de 6 animais. Cada cigarro demorava em torno de 7-10 min

para ser queimado. Os ratos permaneciam na caixa por um período adicional de 30 minutos. Após o período total do tratamento, os animais foram sacrificados por concussão cerebral, e seus pulmões foram retirados. A extração e hidrólise do DNA foram realizadas segundo os itens 3.6 e 3.8. O esquema 3.2 ilustra a exposição dos animais à fumaça de cigarro.



Esquema 3.2: Ilustração da exposição dos animais à fumaça de cigarro.

3.12.2- Tratamento por 180 dias

O tratamento dos animais, ratos *Wistar* (machos) por um período de 6 meses foi semelhante ao descrito no item 3.12.1. Estes também foram suplementados com doses diárias de β -caroteno (10 mg/kg) *i.p.* Entretanto como o período de tratamento foi mais longo, os ratos foram expostos à fumaça de cigarro apenas uma vez ao dia e durante 5 dias por semana. Os animais quando começaram a ser tratados, pesavam em torno de 100 g e tinham um mês de idade. Ao término do tratamento, os ratos já superavam o peso de 500 g. Novamente, dividiu-se os animais em 5 grupos: controle, veículo, β -caroteno, fumaça e fumaça com suplementação de β -caroteno. A extração e hidrólise do DNA foram realizadas segundo os itens 3.6 e 3.8.

3.13- Ensaio de comunicação intercelular via junções comunicantes em células tratadas com β -caroteno e zeaxantina oxidados

3.13.1- Oxidação do β -caroteno e da zeaxantina

Os carotenóides foram dissolvidos em clorofórmio e oxidados utilizando-se concentração catalítica de um iniciador radicalar AMVN (2,2-azo-bis-2,4-dimetilvaleronitrila). A mistura foi agitada a 40 - 60 °C. A oxidação foi monitorada por HPLC (Sistema 7) até que todo o carotenóide fosse oxidado (Handelman e col., 1991, Kim e col., 2001).

3.13.2- Cultivo da células WB-F344

Foram utilizadas, células epiteliais de fígado de ratos linhagem (WB-F344). As células foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DME) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina, 0,02 g/L de penicilina/estreptomicina em placas de plástico. As células foram incubadas a 37 °C em uma estufa umidificada com atmosfera contendo 5 % CO₂. Células WB-344 confluentes foram incubadas com DME sem SFB por 24 h para diminuir o nível basal de comunicação intercelular (Ale-Agha, e col., 2002).

3.13.3- Tratamento das células WB-344 com produtos de oxidação do β -caroteno e da zeaxantina e medida do número de células comunicantes

O número de células comunicantes foi medido após o tratamento das células WB-F344 com produtos de oxidação do β -caroteno e da zeaxantina. O ensaio foi realizado utilizando-se o corante fluorescente “dye lucifer” (Ale-Agha col., 2002). O efeito do β -Apo-8'-carotenal, um produto de oxidação do β -caroteno, também foi investigado. Ácido retinóico foi usado como controle positivo (Teicher e col., 1999).

As células foram expostas a 1,8 μM dos carotenóides oxidados (vide item 3.13.1) e 2,4 μM de β -apo-8'-carotenal por 24 e 72 horas. Após o tratamento, a comunicação intercelular por junções comunicantes (GJC) foi determinada. Etanol (0,2 %) foi usado como controle. GJC foi medido pela microinjeção do corante fluorescente (Lucifer Yellow CH – 10% em 0,33M LiCl) em células escolhidas usando um sistema contendo um micromanipulador e um microinjetor (Eppendorf). Após um minuto da injeção, o número de células fluorescentes ao lado de uma única célula carregada com o corante, foi contado. A cada placa, dez diferentes células foram injetadas com o corante e a média do número de células vizinhas foi calculada (Ale-Agha e col., 2002). Posteriormente, estes experimentos foram novamente realizados, utilizando-se também os carotenóides não oxidados, β -caroteno e zeaxantina, nas mesmas concentrações de seus produtos de oxidação. Para isto, todos os carotenóides foram solubilizados em THF e depois diluídos em solução de etanol.

3.14- Análise estatística dos dados

As comparações estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste independente de duas populações, *Student's t-test*, considerando $p < 0,05$.

Resultados

4- RESULTADOS

4.1 – Detecção e análise dos produtos formados na reação entre 2'-desoxiguanosina (dGuo) e retinal

Diversos trabalhos na literatura, inclusive os realizados pelo nosso laboratório, mostram que aldeídos α,β -insaturados, quando expostos a peróxidos, podem sofrer epoxidação e reagirem com as bases de nucleotídeos ou nucleosídeos de DNA levando a formação de adutos (Nair e Offerman, 1985; Sodum & Chung, 1988; Sodum & Chung, 1989; Chung e col., 1996; Carvalho e col., 1998; Carvalho e col., 2000; Loureiro e col., 2000). Considerando a importância biológica de aldeídos formados como produtos da oxidação do β -caroteno, decidimos investigar os produtos de reação entre a 2'-desoxiguanosina (dGuo) e o retinal.

Após extensivos estudos, verificamos que com a adição de peróxido de hidrogênio, foi possível verificar a formação de novos produtos com o nucleosídeo. O aumento da concentração de peróxido e do pH foi importante para o rendimento da reação, uma vez que o H_2O_2 se decompõe extremamente rápido, nas primeiras horas de reação, principalmente em pH básico. A reação entre retinal e dGuo na presença de peróxido resulta na formação de vários produtos (vide Materiais e Métodos item 3.2.2, sistema 1). Dos produtos estáveis, isolamos os produtos A e os produtos B1 e B2 que estão mostrados na figura 4.1

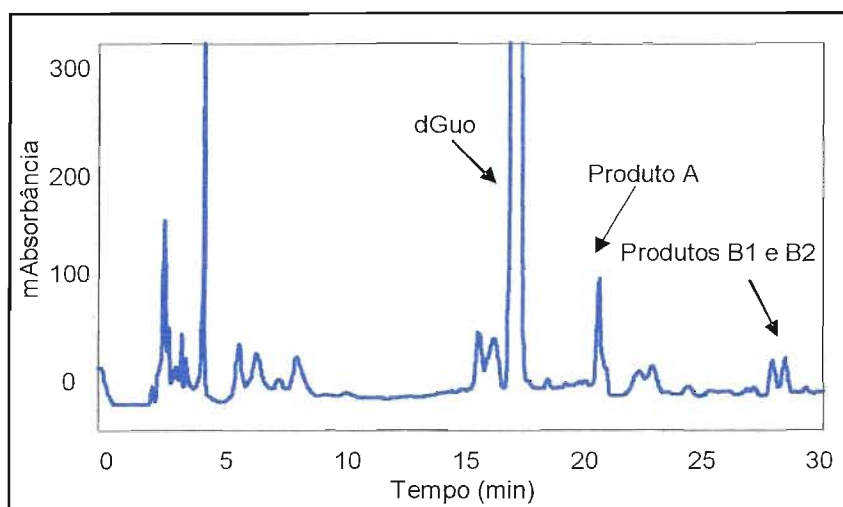


Figura 4.1: Cromatograma obtido por HPLC da incubação entre retinal, dGuo e H_2O_2 (50 mM). Detecção por UV a 254 nm.

Após o isolamento, os produtos foram liofilizados para a remoção do solvente e em seguida repurificados por HPLC (vide Materiais e Métodos item 3.2.2 sistema 2). O cromatograma obtido após a separação dos produtos B1 e B2, assim como seus espectros de ultravioleta estão mostrados nas figuras 4.2. e 4.3.

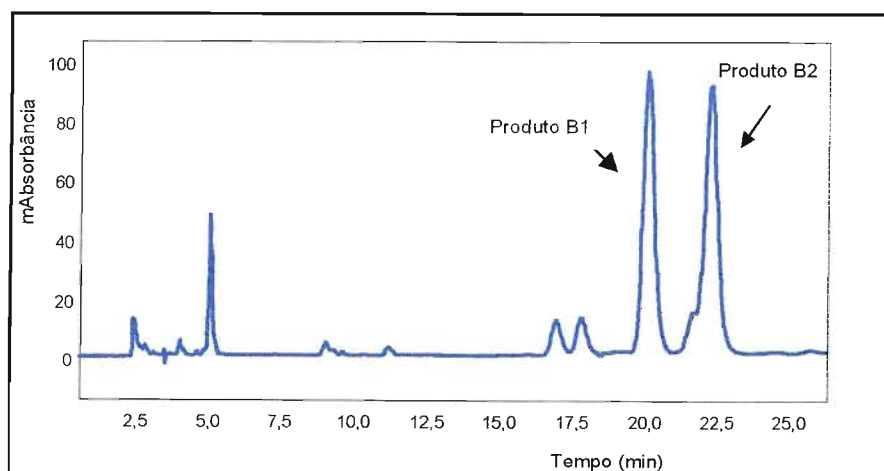


Figura 4.2: Cromatograma obtido por HPLC da purificação dos produtos B1 e B2. Detecção por UV a 254 nm.

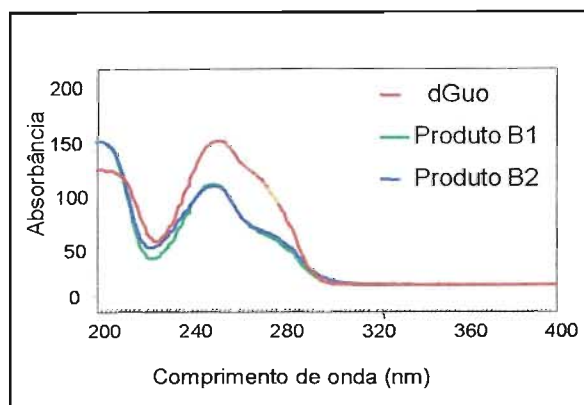


Figura 4.3: Espectros de ultravioleta dos produtos B1 e B2.

Após o isolamento por HPLC, esses produtos foram analisados por espectrometria de massa (vide Materiais e Métodos item 3.3.2). Analisando-se os espectros obtidos por sua relação massa/carga em diferentes voltagens do cone, verificamos que o produto B1, (Figura 4.4) apresenta o íon molecular, $[M + H]^+$ m/z : 406. A perda da desoxirribose (dR) pode ser também verificada pelo fragmento $[M + H]^+ - dR$ m/z : 290. Verifica-se também a presença dos fragmentos $[M + Na]^+$ m/z : 428 e $[M + K]^+$ m/z : 444. As cationizações verificadas nos mostram que o íon molecular do composto é realmente o atribuído. A perda do fragmento de massa 116 da desoxirribose mostra que o produto se trata de uma modificação ocorrida no nucleosídeo, sendo assim, um aduto de DNA.

Já, pela análise do espectro do produto B2 (Figura 4.5), nota-se que este apresenta o mesmo valor para o íon molecular e para o fragmento de perda da dR que o produto B1. Este dado, somado à similaridade de seus espectros de ultravioleta (Figura 4.3) e a proximidade com que estes produtos são eluídos por HPLC são indicativos de que se tratam de diastereoisômeros. Ressaltamos que a cromatografia líquida pode separar diastereoisômeros pois a inversão na configuração de apenas um carbono pode fazer com que seus substituintes interajam diferentemente com a fase apolar da coluna, neste caso, uma coluna C18. Esta diferença na interação pode fazer com que um deles fique um pouco mais retido, permitindo assim a separação do par. Iniciamos análises por ressonância magnética nuclear. Entretanto o rendimento da reação, por ser

extremamente baixo impossibilitou a obtenção de espectros de ressonância bem definidos e que nos fornecessem uma identificação precisa da estrutura química dos produtos. Sendo assim, resolvemos nos concentrar no produto A, como mostraremos a seguir. Vale ressaltar que a incubação entre DNA de timo de bezerro nas mesmas condições mostra a formação de produtos com o mesmo comportamento de fragmentação dos adutos B1 e B2, um indicativo de que estes produtos ocorrem não apenas em nucleosídeos, mas também em DNA. Sendo assim, a otimização desta metodologia de reação a fim de se conseguir a caracterização completa da estrutura química destes outros adutos pode ser um objeto de estudo interessante a ser desenvolvido no futuro.

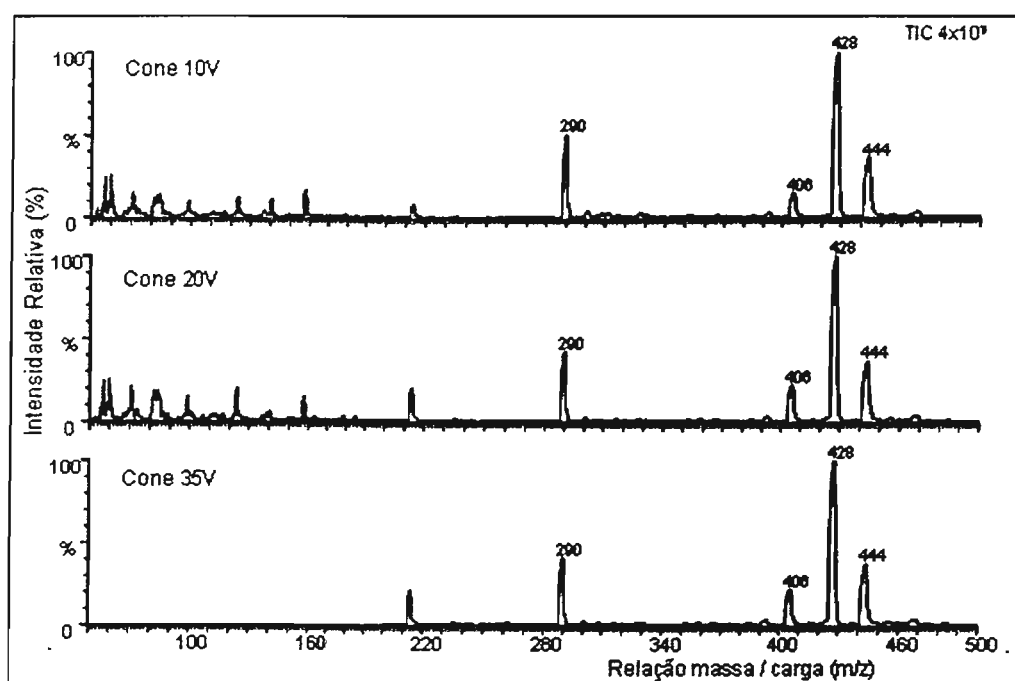


Figura 4.4: Espectro de massa do produto B1 em diferentes voltagens do cone. Sendo: $[M + H]^+$ m/z: 406; $[M + H]^+ - dR$ m/z: 290; $[M + Na]^+$ m/z: 428 e $[M + K]^+$ m/z: 444.

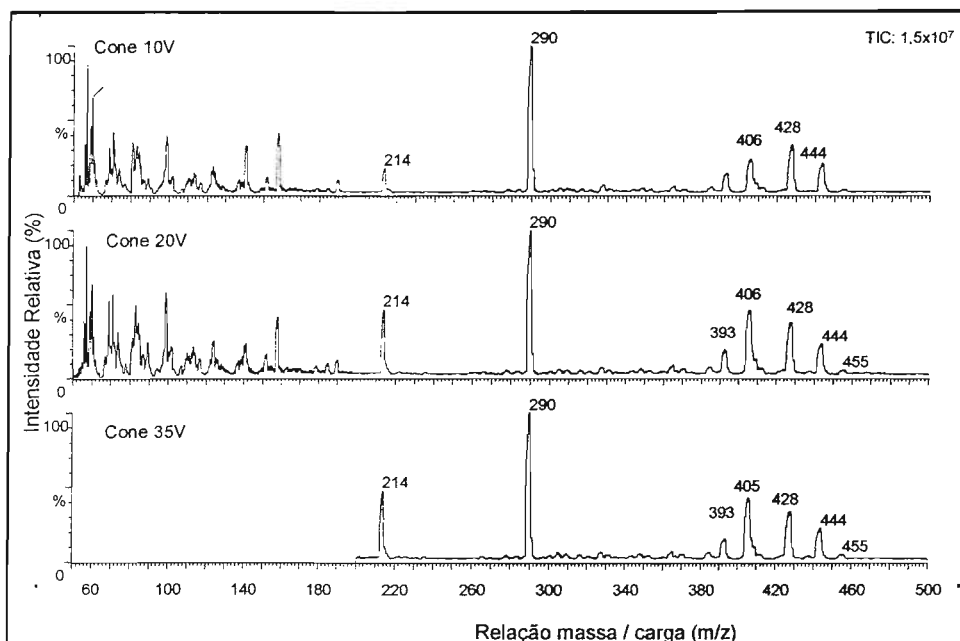


Figura 4. 5: Espectro de massa do produto B2 em diferentes voltagens do cone. Sendo: $[M + H]^+$ m/z: 406; $[M + H]^+ - dR$ m/z: 290; $[M + Na]^+$ m/z: 428 e $[M + K]^+$ m/z: 444.

O produto A também foi isolado e repurificado por HPLC (vide Materiais e Métodos item 3.2.2 Sistema 3). A reinjeção do pico correspondente ao produto A, mostra a presença de 4 produtos. Dentre estes, o produto 1 apresentava características espectrais semelhantes ao eteno aduto já descrito na literatura (Sattangi e col., 1977; Sodum & Chung, 1988; Loureiro e col., 2000) (Figura 4.6). Sendo assim, os demais estudos concentraram-se na formação deste aduto de DNA em diferentes modelos de sistemas biológicos. O produto 2 também apresenta características de aduto de DNA e possui íon molecular $[M + H]^+$ m/z: 366, $[M + H]^+ - dR$ m/z: 250, como indica seu espectro de massa (Figura 4. 7).

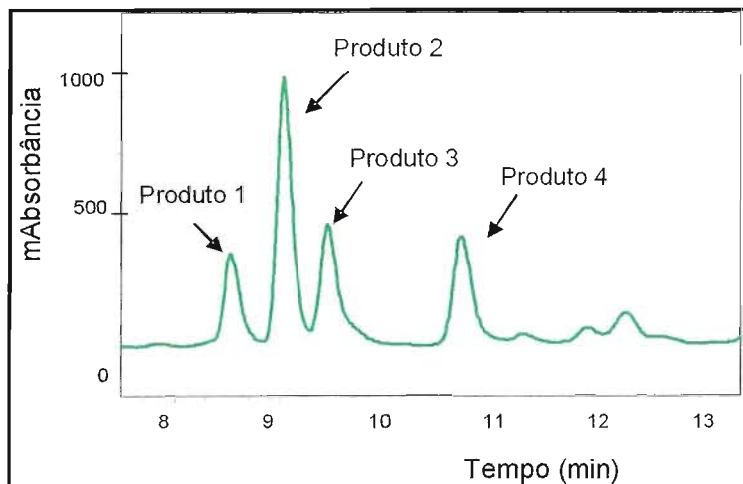


Figura 4.6: Cromatograma obtido por HPLC na purificação do produto A (Detecção por UV a 254 nm).

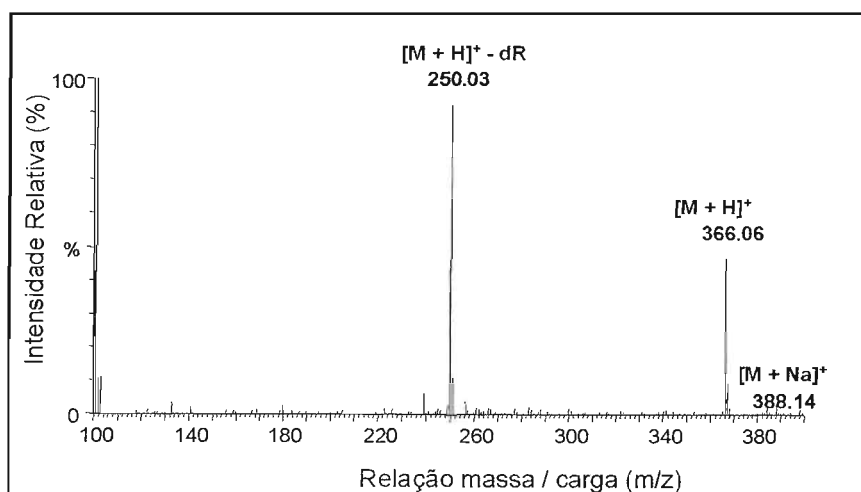


Figura 4.7: Espectro de massa do produto 2.

4.1.2 – Caracterização química e espectroscópica do produto 1

Após o isolamento, o produto 1 foi analisado por espectrometria de massa, obtendo-se para ele o íon molecular $[M+H]^+$ m/z : 292 e o fragmento referente à perda da desoxirribose $[M + H]^+ - dR$ m/z : 176 (Figura 4.8). Relacionando-se o dado da espectrometria de massa com o espectro de ultravioleta (Figura 4.9), verificamos que este produto se tratava do eteno aduto, 1, N^2 - ϵ dGuo (Sodum & Chung, 1988; Sattsangi e col., 1977). Este aduto, já havia sido previamente detectado em nosso laboratório e por isso tínhamos seu padrão para demais comparações (Loureiro e col., 2000). O espectro de ressonância magnética nuclear também nos forneceu os dados compatíveis com nosso padrão e com a literatura (Sodum & Chung; 1988; Loureiro e col., 2000). Os deslocamentos químicos do 1H RMN estão mostrados na tabela 4.1.

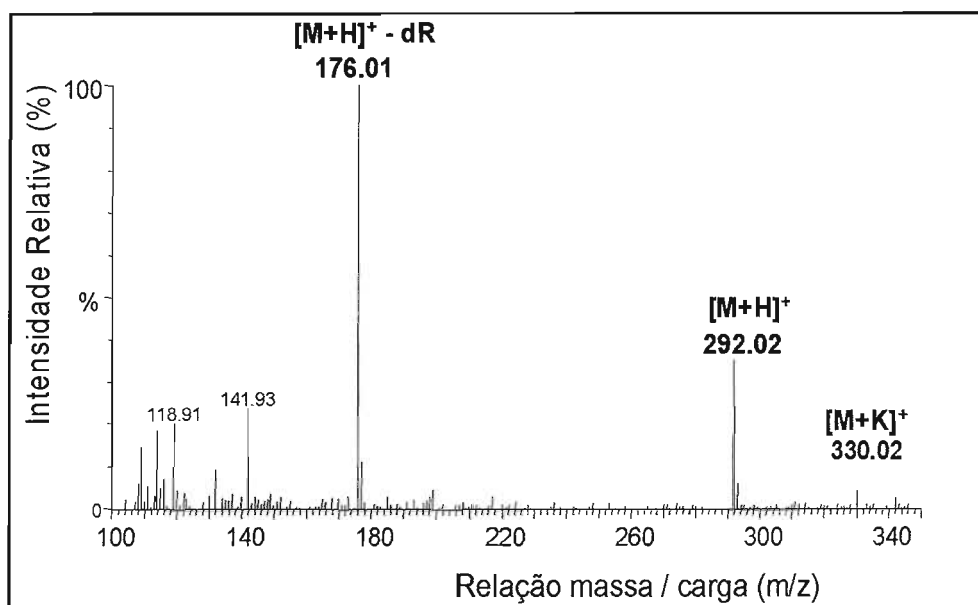


Figura 4.8: Espectro de massa do produto 1: 1,N²-εdGuo.

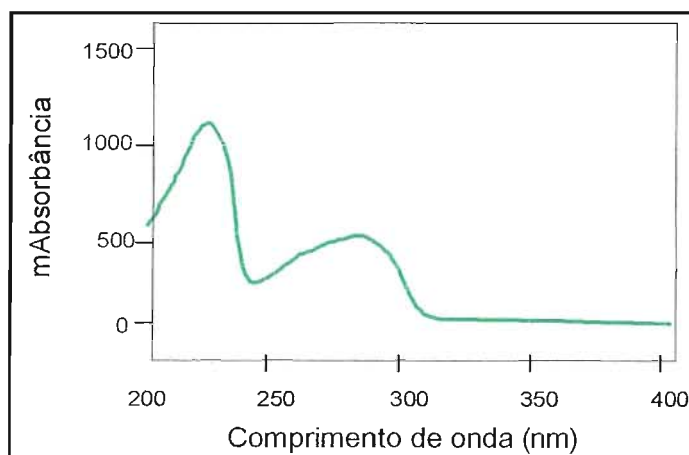
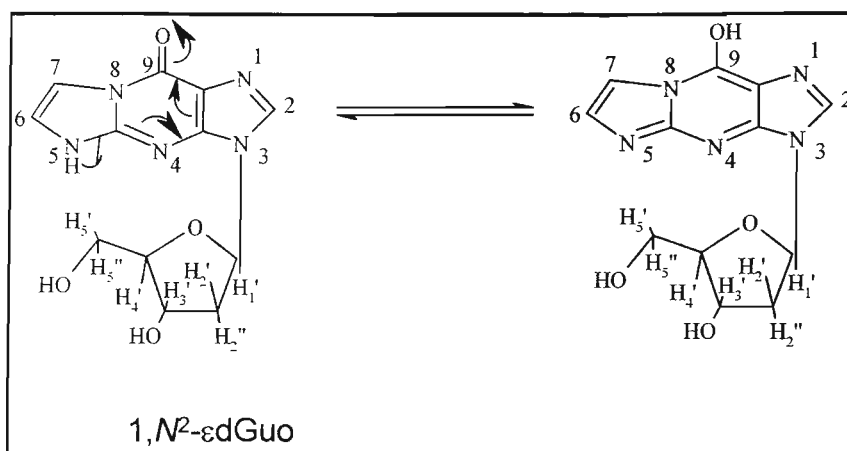


Figura 4.9: Espectro de ultravioleta do produto 1: 1,N²-εdGuo.

Tabela 4. 1: Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do aduto $1,N^2$ - ϵ dGuo.

	δ (ppm)	Tipo	J (Hz)
H _{1'}	6,23-6,26	N-CH-O	2,5 Hz
H _{2'}	2,59-2,62	CH ₂ -C	
H _{2''}	2,23-2,27	CH ₂ -C	
H _{3'}	4,36	HO-CH	
H _{4'}	3,83-3,84	O-CH	
H _{5'}	3,56-3,60	HO-CH ₂	
H _{5''}	3,51-3,54	HO-CH ₂	
OH - 3'	5,2.6-5,27	HO-CH	
OH - 5'	4,92	HO-CH ₂	
H-2	8,12	N=CH-N	
H-6	7,60	C=CH-N	
H - 7	7,42	C=CH-N	
H - N ₅	6,47	NH	

O esquema 4.1 mostra a estrutura do produto $1,N^2$ - ϵ dGuo e a existência de um tautomerismo na molécula.



Esquema 4.1: Estrutura do 1,N²-εdGuo e o tautomerismo presente na molécula.

O 1,N²-εdGuo é um aduto que já estava descrito como produto de reação da 2'-desoxiguanosina com aldeídos como 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e *trans*, *trans*-2,4-decadienal (DDE) (Goldschmidt, e col., 1968, Sattangi, e col., 1977, Sodum & Chung, 1988, Sodum & Chung, 1989, Sodum & Chung, 1991, Loureiro e col., 2000). Este aduto é comprovadamente mutagênico e leva a transições G → A e transversões G → T. A mutagenicidade deste aduto já foi também verificada *in vivo* (Langouët e col., 1997 e Langouët e col., 1998).

4.2- Validação da metodologia da detecção do 1,N²-εdGuo por LC/ESI/MS-MS

4.2.1- Desenvolvimento, padronização e validação de metodologia para a detecção sensível do 1,N²-εdGuo por LC/ESI/MS-MS em sistemas biológicos

Após a verificação de que o retinal levava à formação do 1,N²-εdGuo quando reage com 2'-desoxiguanosina *in vitro* e na presença de H₂O₂, era necessário investir na padronização de metodologias mais sensíveis e específicas que a detecção por ultravioleta, para que, assim, pudéssemos investigar a formação desse aduto em DNA tratado com β-caroteno e seus metabólitos, e também para estudos *in vivo*.

O maior desafio deste método foi isolar o analito (1,N²-εdGuo) em concentrações muito pequenas em comparação com as bases não modificadas, permitindo uma análise direta das amostras para verificar a presença do aduto de interesse. Para isto foi utilizada a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. Este método foi desenvolvido em colaboração com a Dra. Ana Paula de Melo Loureiro, na época, pós-doutora do nosso laboratório.

O método de cromatografia líquida desenvolvido permitiu uma separação adequada do aduto em relação ao último nucleosídeo eluído após a hidrólise do DNA (vide materiais e métodos item 3.4), a (dThd). A ordem de eluição dos nucleosídeos é dCyd < dAdo < dGuo < dThd. A válvula direcionadora de fluxo foi fundamental para o desenvolvimento da metodologia pois permitiu programar o intervalo entre a eluição da dThd e do aduto em questão, garantindo que não haveria supressão do sinal do aduto devido a presença de alta concentração do nucleosídeo. A eluição do aduto por uma segunda coluna, esta capilar, logo com um fluxo bem pequeno, fornece uma purificação adicional do analito frente a outras possíveis interferências, aumentando assim, a sensibilidade de sua detecção. A figura a seguir (4.10) ilustra o padrão de eluição dos nucleosídeos e do aduto em questão.

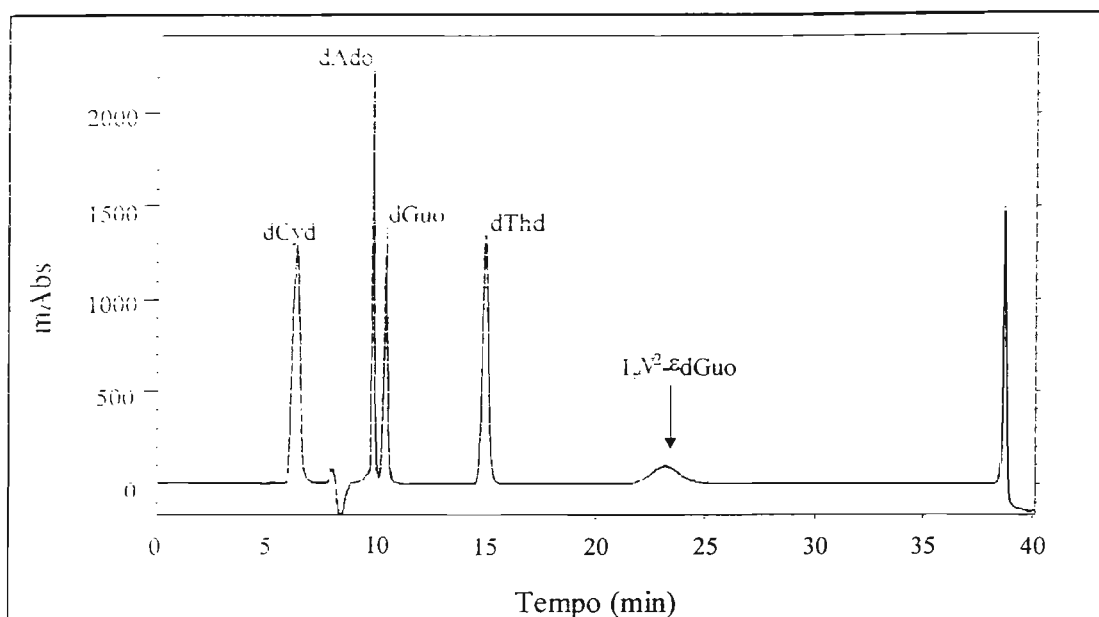


Figura 4.10: Padrão de eluição de uma mistura normal de nucleosídeos através de uma coluna analítica utilizando-se o sistema *on line* LC/ESI/MS-MS.

Em todas as análises e também no desenvolvimento da metodologia, foi efetuada a adição do padrão de $1,N^2$ - ϵ dGuo isotopicamente marcado com nitrogênio 15 ($[^{15}\text{N}_5]$ - $1,N^2$ - ϵ dGuo), previamente sintetizado no nosso laboratório (Loureiro e col., 2000). O uso deste isótopo garante uma maior especificidade e maior exatidão na quantificação do $1,N^2$ - ϵ dGuo. As figuras 4.11 e 4.12 ilustram a varredura e os íons produzidos no espectro de massa do $1,N^2$ - ϵ dGuo e do $[^{15}\text{N}_5]$ - $1,N^2$ - ϵ dGuo. Para o $1,N^2$ - ϵ dGuo verificamos o íon molecular $[M+H]^+$ com m/z 292, o fragmento predominante sob as condições experimentais possui m/z a 176, $[M+H]^+ - 2\text{-D-erythro-pentose}$, ou seja, perda da desoxirribose. Como era esperado, um padrão similar foi obtido para o $[^{15}\text{N}_5]$ - $1,N^2$ - ϵ dGuo, sendo $[M+H]^+$ m/z a 297 e $[M+H]^+ - 2\text{-D-erythro-pentose}$, m/z a 181. Este incremento de cinco unidades de massa é devido à presença dos cinco átomos de nitrogênio 15.

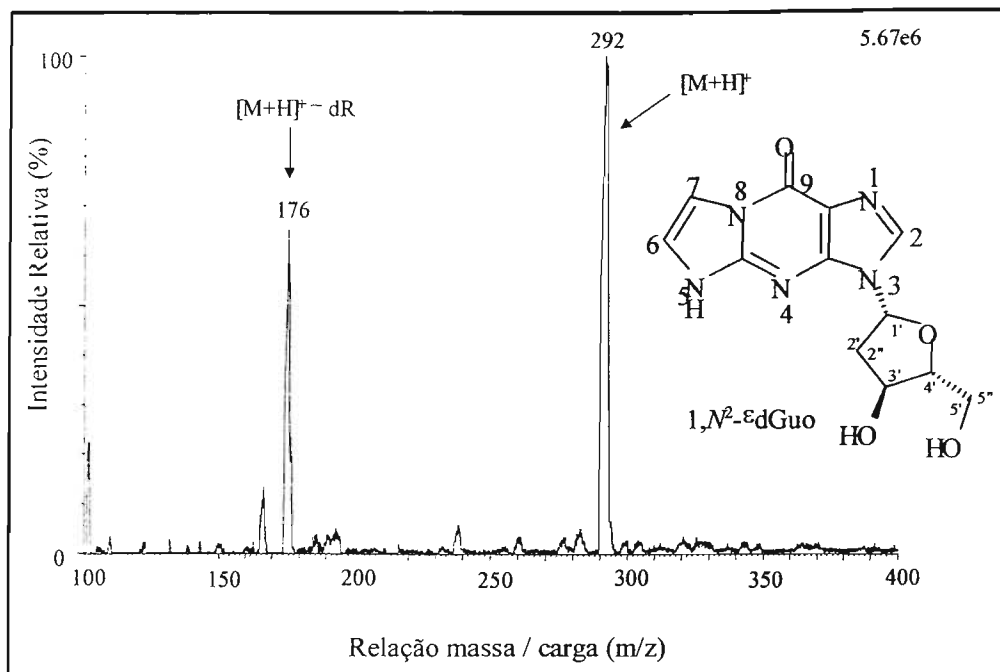


Figura 4.11: Espectro de massa do 1,N²-εdGuo.

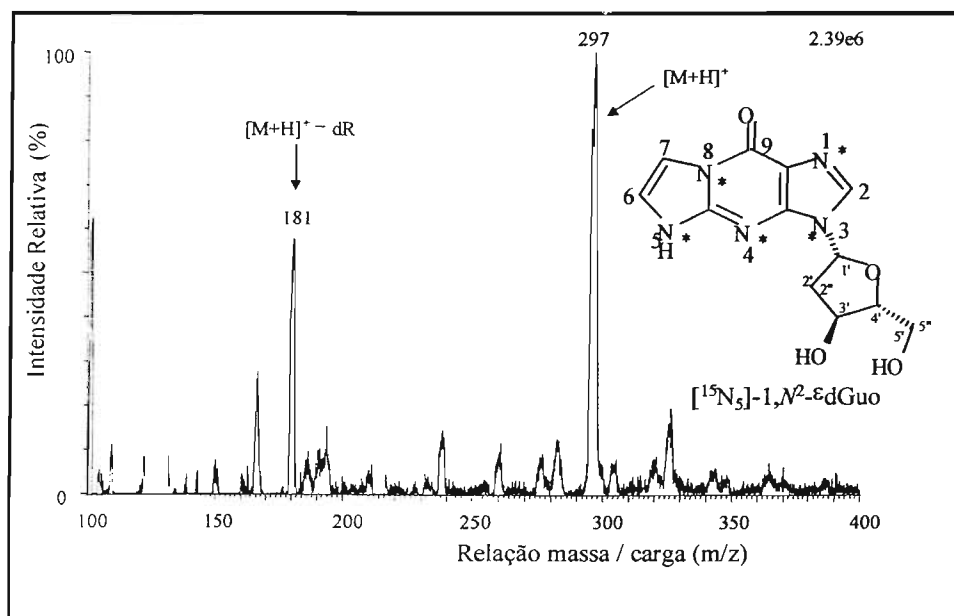


Figura 4.12: Espectro de massa do [¹⁵N₅]-1,N²-εdGuo.

Nas análises das amostras, utilizamos o sistema de LC/ESI/MS-MS com a função Monitoramento de Reação Múltipla (MRM). Com ela, selecionamos as transições m/z 292 e 176 do $1,N^2$ - ϵ dGuo e 297 e 181 do $[^{15}\text{N}_5]$ - $1,N^2$ - ϵ dGuo. A figura 4.13 mostra o cromatograma obtido por MRM utilizando-se as transições acima mencionadas. O pico do padrão, $1,N^2$ - ϵ dGuo, mostrado no cromatograma corresponde a 20 fmol do aduto. Este foi o limite de detecção obtido para a injeção deste padrão. A relação sinal / ruído (S/N) é de 3:1.

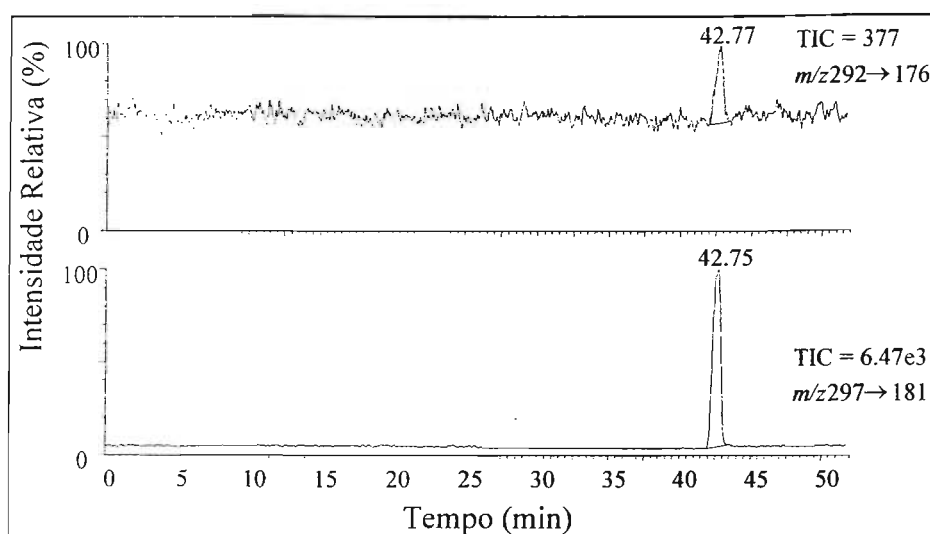


Figura 4.13: Detecção de 20 fmol do padrão, $1,N^2$ - ϵ dGuo por análise de LC/ESI/MS-MS no modo MRM. $1,N^2$ - ϵ dGuo: m/z 292 → 176; $[^{15}\text{N}_5]$ - $1,N^2$ - ϵ dGuo: m/z 297 → 181.

A fim de se verificar a linearidade e a precisão do método, e também para conseguirmos quantificar a formação do aduto em questão, foi necessário fazer uma curva de calibração. Foram efetuadas análises para dez pontos com diferentes concentrações do $1,N^2$ - ϵ dGuo (5 - 5000 fmol/ para cada injeção), mantendo-se para cada ponto uma quantidade constante do padrão isotopicamente marcado (1000 fmol). A curva foi construída plotando a relação das áreas do padrão $1,N^2$ - ϵ dGuo e $[^{15}\text{N}_5]$ - $1,N^2$ - ϵ dGuo *versus* a concentração de padrão $1,N^2$ - ϵ dGuo adicionado. Entre os pontos foram realizadas injeções do padrão isotopicamente marcado. Este procedimento permitiu verificar que não

ocorre contaminação provocada pelas corridas anteriores e que o padrão isotópico também não estava contaminado com padrão $1,N^2$ - ϵ dGuo. A figura 4.14 mostra a curva de calibração realizada ($r^2 = 0.999$, desvio padrão = 6,7%).

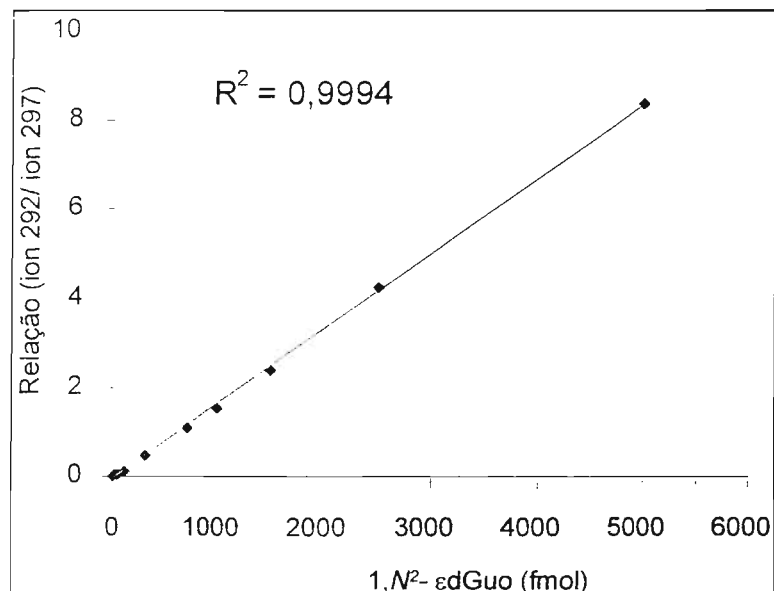


Figura 4.14: Curva de calibração do $1,N^2$ - ϵ dGuo.

O limite de quantificação basal do método desenvolvido para a verificação da formação de $1,N^2$ - ϵ dGuo presente em amostras de DNA de timo de bezerro comercial, sem prévia incubação, foi de $1,70 \pm 0,09$ adutos / 10^7 dGuo, o que equivale a 46,36 fmol de aduto. Este limite foi verificado após a injeção de 354 μ g de DNA hidrolizados. Vale ressaltar que esta foi a primeira vez que este aduto teve seu nível basal detectado. Estas amostras foram realizadas em triplicatas. A relação sinal-ruído da transição do $1,N^2$ - ϵ dGuo, m/z 292 \rightarrow 176, foi de 7:1. O limite de detecção em amostras de DNA do método é de 7,4 adutos / 10^8 dGuo (20 fmol de aduto).

Analisando-se diferentes concentrações de DNA de timo de bezerro (20 μ g, 50 μ g, 75 μ g, 100 μ g) "contaminadas" com 100 a 1000 fmol de $1,N^2$ - ϵ dGuo antes da hidrólise, verificamos que o aumento da quantidade de DNA não leva à supressão da resposta do aduto. O desvio padrão relativo para as amostras

“contaminadas” com 100 fmol, 300 fmol, 500 fmol e 1000 fmol de 1,N²-εdGuo foram: 16,5%, 3,8%, 1,2% e 4,0% respectivamente.

Para a injeção de 61 µg de DNA de fígado de ratas não tratadas, o valor obtido foi de $9,43 \pm 0,87$ adutos / 10^7 dGuo, o que equivale a $43,68 \pm 4,03$ fmol de 1,N²-εdGuo / amostra de DNA. Para se verificar a exatidão do método, foram adicionados as seguintes concentrações do aduto: 10 fmol, 50 fmol, 100 fmol e 500 fmol. Os valores de 1,N²-εdGuo detectados nas amostras foram os seguintes: $52,37 \pm 6,60$ fmol, $96,16 \pm 4,19$ fmol, $147,72 \pm 6,93$ fmol e $563,14 \pm 14,14$ fmol. Estes valores refletem com exatidão as quantidades adicionadas do padrão.

Com este novo método, foi possível detectarmos pela primeira vez o nível basal de 1,N²-εdGuo em DNA de timo de bezerro comercial, assim como em DNA de fígado de ratas *Wistar* sem tratamento algum. A análise de amostras de DNA de fígado de um grupo (n=3) de ratas *Wistar* não tratadas (130 µg) confirmou a ocorrência do aduto a um nível basal de $5,22 \pm 1,37$ 1,N²-εdGuo / 10^7 dGuo. Esta é a primeira vez que se detecta a ocorrência de níveis basais deste aduto *in vivo*. A figura 4.15 mostra um exemplo dos cromatogramas obtidos para estas análises.

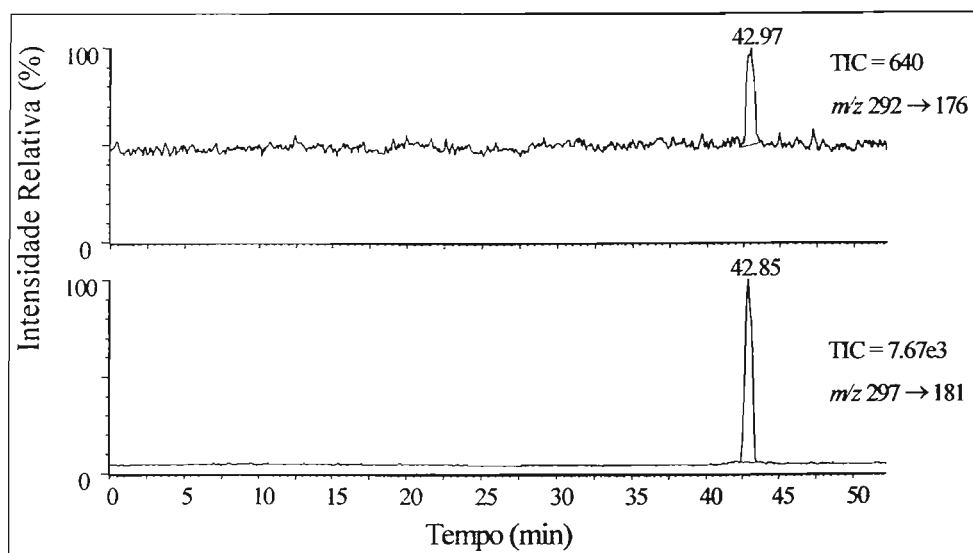


Figura 4.15: Exemplo de detecção de 1,N²-εdGuo em amostra de DNA de fígado de rata não tratada pelo método de LC/ESI/MS-MS e função MRM.

O método também foi utilizado para se detectar o nível basal de 1,N²-εdGuo em DNA de células CV1-P. Estas análises foram realizadas em duas diferentes ocasiões, utilizando-se 124 μg de DNA. Os resultados obtidos foram $4,48 \pm 0,42$ adutos / 10^7 dGuo, para cinco amostras e $4,55 \pm 0,37$ adutos / 10^7 dGuo também para cinco amostras, confirmando a precisão do método.

A tabela a seguir (Tabela 4.2) resume os níveis basais detectados na validação desta metodologia.

Tabela. 4.2: Níveis basais de 1,N²- ϵ dGuo obtidas pela metodologia de LC/ESI/MS-MS

<i>Amostra</i>	<i>1,N²-ϵdGuo / 10⁷ dGuo</i>
DNA de timo de bezerro (n=3)	1,70 \pm 0,09
DNA de fígado de rata (n=3)	5,22 \pm 1,37
DNA de células CV1-P (n=10)	4,5 \pm 1,37

Os dados existentes até o momento indicam que os eteno adutos em DNA são lesões geradas não apenas por compostos exógenos, mas também podem ser formados por compostos gerados endogenamente.

4.3- Quantificação das lesões em DNA induzidas por carotenóides

4.3.1- Lesões em 2'-desoxiguanosina (dGuo) *in vitro* promovidas por carotenóides

No início de nossos estudos, verificamos a formação de novos produtos, incluindo o aduto 1,N²-εdGuo quando reagimos retinal e o nucleosídeo, dGuo. Sendo assim, procedemos a quantificação por LC/ESI/MS-MS. Para fins comparativos, também efetuamos a quantificação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), oxidação na 2'-desoxiguanosina, analisada por HPLC acoplado à detecção eletroquímica.

4.3.1.1- Detecção e quantificação da lesão 1,N²-εdGuo em incubações entre dGuo e carotenóides

Como já mencionado, havíamos verificado a formação do aduto, 1,N²-εdGuo com o nucleosídeo, dGuo, incubado com o retinal na presença de peróxido. Entretanto, apenas pela análise por HPLC com detecção UV não havia sido possível verificar a formação desta lesão em sistemas sem a adição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ – 50 mM). Com o desenvolvimento de nova metodologia por espectrometria de massa, conseguimos detectar o aduto nas reações com o nucleosídeo, incubado sem adição de peróxido e também em condições de pH fisiológico (pH 7,4). Com a outra metodologia (HPLC/ Detecção UV), só havíamos testado o pH 9,4 que facilita o mecanismo de reação. Os resultados obtidos pela análise por LC/ESI/MS-MS nos tratamentos de dGuo tanto em pH 9,4 quanto em pH 7,4 estão descritos nas tabelas 4.3 e 4.4 e figuras 4.16 e 4.17).

Tabela 4.3: Níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH 9,4.

dGuo- pH 9,4	$1,N^2$ - ϵ dGuo/ 10^7 dGuo
Controle	7 ± 2
Retinal	4733 ± 390^a
β - Apo-8' carotenal	406 ± 28^a
β - Caroteno	1908 ± 170^a
Controle + H_2O_2	40 ± 8
Retinal + H_2O_2	11628 ± 932^b
β - Apo-8' carotenal + H_2O_2	3240 ± 108^b
β -Caroteno + H_2O_2	7261 ± 373^b

Reação incubada a 37 °C por 72 h tanto na ausência como na presença de H_2O_2 (50 mM). Sendo n = 3. ^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H_2O_2 teste t ($p < 0,05$).

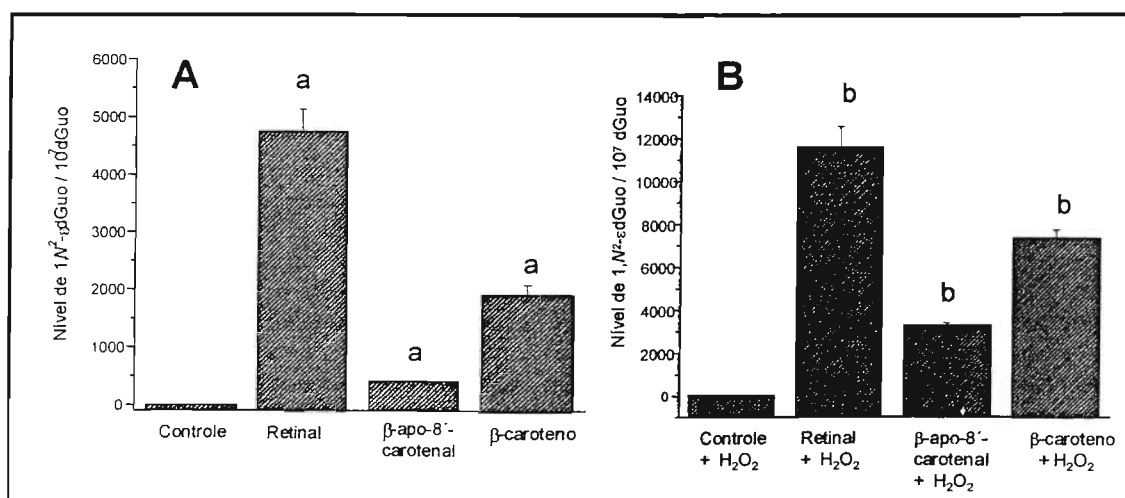


Figura 4.16: Níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH 9,4.

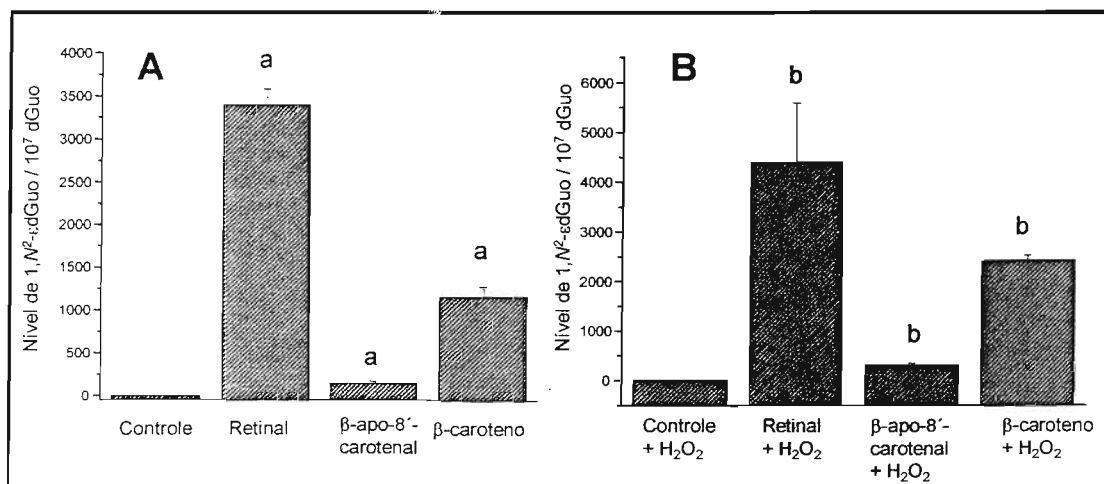
A: incubações sem adição de H_2O_2 B: incubações com adição de H_2O_2 (50 mM).

^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H_2O_2 teste t ($p < 0,05$).

Tabela 4.4: Níveis de 1,N²-εdGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH7,4.

dGuo- pH 7,4	1,N ² -εdGuo/10 ⁷ dGuo
Controle	2,1 ± 0,6
Retinal	3390 ± 185 ^a
β- Apo-8' carotenal	145 ± 22 ^a
β- Caroteno	1149 ± 124 ^a
Controle + H ₂ O ₂	2,4 ± 0,4
Retinal + H ₂ O ₂	4402 ± 1188 ^b
β- Apo-8' carotenal + H ₂ O ₂	308 ± 44 ^b
β-Caroteno + H ₂ O ₂	2397 ± 119 ^b

Reação incubada a 37 °C por 72 h tanto na ausência como na presença de H₂O₂ (50 mM). Sendo n = 3. ^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H₂O₂ teste t (p < 0,05).

Figura 4.17: Níveis de 1,N²-εdGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH 7,4.

A: incubações sem adição de H₂O₂; **B:** incubações com adição de H₂O₂ (50 mM).

^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H₂O₂ teste t (p < 0,05).

Os dados indicam que em ambos os tratamentos (pH 7,4 e pH 9,4) houve um aumento na formação do aduto após o tratamento com os carotenóides. Além disso, os níveis obtidos em pH 9,4 são superiores aos obtidos em pH 7,4 devido ao favorecimento do mecanismo da reação nesta condição. Além disso, é possível se verificar pela análise dos resultados que a adição de peróxido também é outro fator de favorecimento da reação, como já observado para a formação de eteno adutos a partir de outros aldeídos (Loureiro e col., 2000; Morinello e col., 2001).

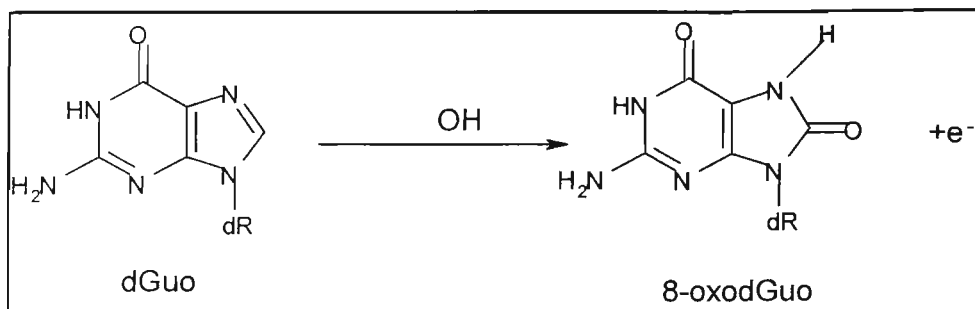
4.3.1.2- Detecção e quantificação de 8-oxodGuo em incubações entre carotenóides e dGuo

A literatura já informava que o β -caroteno oxidado e seus produtos de oxidação como o retinal podem levar à formação da lesão 8-oxodGuo em DNA (Murata & Kawanishi, 2000; Yeh e col., 2003). Portanto, o nível desta lesão também foi analisado para efeito de comparação com o nível do eteno aduto.

A 8-oxodGuo é considerada um marcador de lesão oxidativa em DNA e já se conhecem enzimas capazes de efetuar o seu reparo. Esta lesão pode ser produzida por processos oxidativos e espécies reativas, incluindo oxidação por radical hidroxila e peroxinitrito (Floyd e col., 1988; Burrows & Muller, 1998; Cadet e col., 1997). Por estes motivos, a 8-oxoGuo tem sido usada como um possível biomarcador de estresse oxidativo e tem recebido considerável atenção nos últimos anos (Kasai e col., 1992; Breen & Murphy, 1995; Spassky & Angelov, 1997; Helbock e col., 1999).

Reações efetuadas entre DNA de timo de bezerro assim como as realizadas apenas entre dGuo e β -caroteno, β -apo-8'-carotenal e retinal foram analisadas por cromatografia líquida acoplada à detecção eletroquímica (LC/ED).

A estrutura da 8-oxodGuo assim como o padrão de eluição das bases do DNA pela detecção de HPLC/UV e a detecção eletroquímica da 8-oxodGuo estão mostrados no esquema 4.2 e figura 4.18.



Esquema 4.2: Mecanismo de formação da 8-oxodGuo por ação do radical hidroxila.

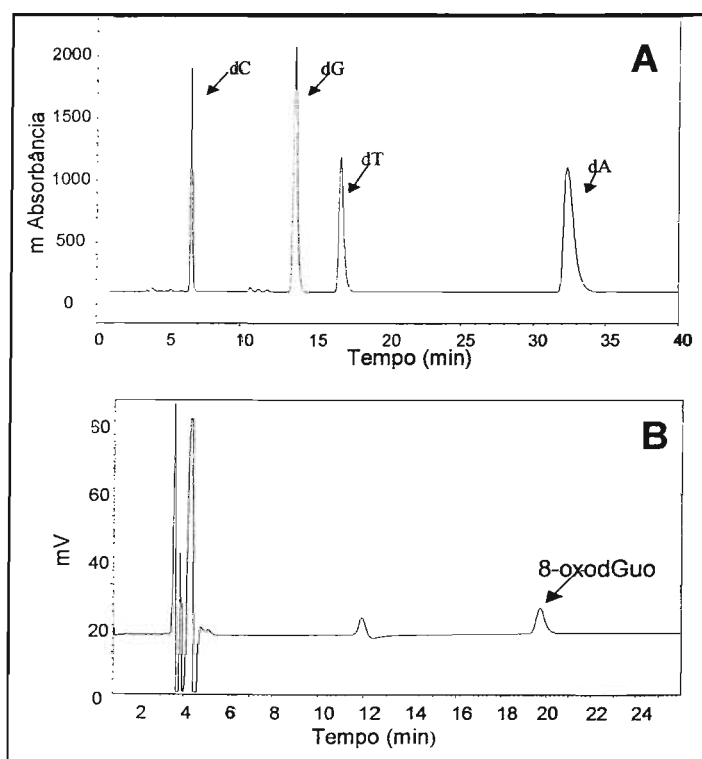


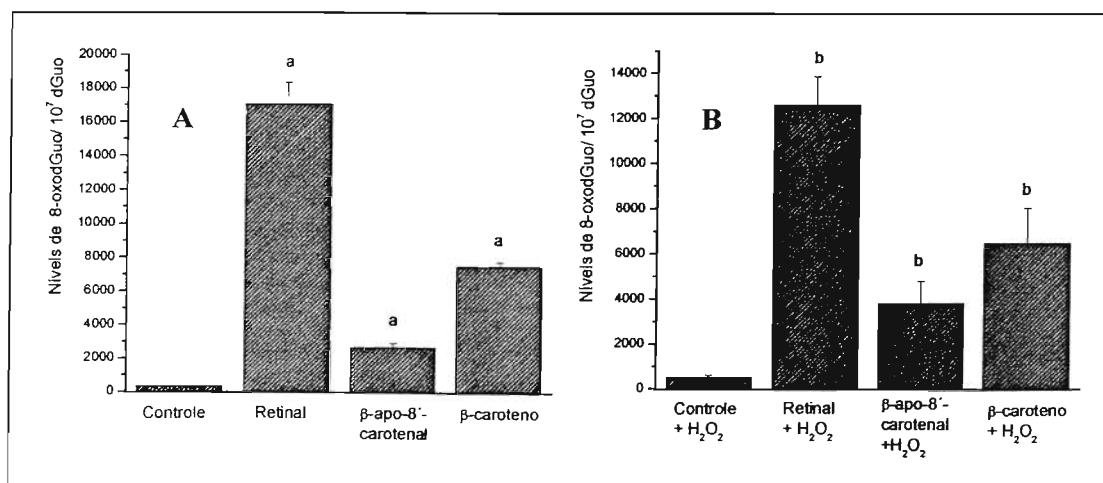
Figura 4.18: Perfil cromatográfico da análise de 8-oxodGuo. **A:** Padrão de eluição das bases por HPLC/UV. **B:** Padrão de eluição de 1 pmol de 8-oxodGuo por HPLC/ Detecção eletroquímica.

Os resultados obtidos na incubações de dGuo com β -caroteno, β -apo-8'-carotenal e retinal nas incubações de pH 9,4 e 7,4 estão mostrados nas tabelas 4.5 e 4.6 e figuras 4.19 e 4.20.

Tabela 4.5: Níveis de 8-oxodGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH 9,4.

dGuo - pH 9,4	8-oxodGuo/10 ⁷ dGuo
Controle	322 ± 12
Retinal	17030 ± 1288 ^a
β- Apo-8' carotenal	2584 ± 289 ^a
β- Caroteno	7406 ± 245 ^a
Controle + H ₂ O ₂	508 ± 84
Retinal + H ₂ O ₂	12595 ± 1233 ^b
β- Apo-8' carotenal + H ₂ O ₂	3801 ± 984 ^b
β-Caroteno + H ₂ O ₂	6474 ± 1539 ^b

Reação realizada a 37°C por 72 h tanto na ausência como na presença de H₂O₂ (50 mM). Sendo n=3. ^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H₂O₂ teste t (p < 0,05).

**Figura 4.19:** Níveis de 8-oxodGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH 9,4.

A: incubações sem adição de H₂O₂; **B:** incubações com adição de H₂O₂ (50 mM).

^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H₂O₂ teste t (p < 0,05).

Tabela 4.6: Níveis de 8-oxodGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH 7,4.

dGuo - pH 7,4	8-oxodGuo/10 ⁷ dGuo
Controle	163 ± 83
Retinal	5296 ± 127 ^a
β- Apo-8' carotenal	333 ± 131
β- Caroteno	3154 ± 229 ^a
Controle + H ₂ O ₂	68 ± 19
Retinal + H ₂ O ₂	24130 ± 2800 ^b
β- Apo-8' carotenal + H ₂ O ₂	482 ± 183 ^b
β-Caroteno + H ₂ O ₂	4210 ± 2343 ^b

Reação realizada a 37°C por 72h tanto na ausência como na presença de H₂O₂ (50 mM). Sendo n=3. ^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H₂O₂ teste t (p < 0,05).

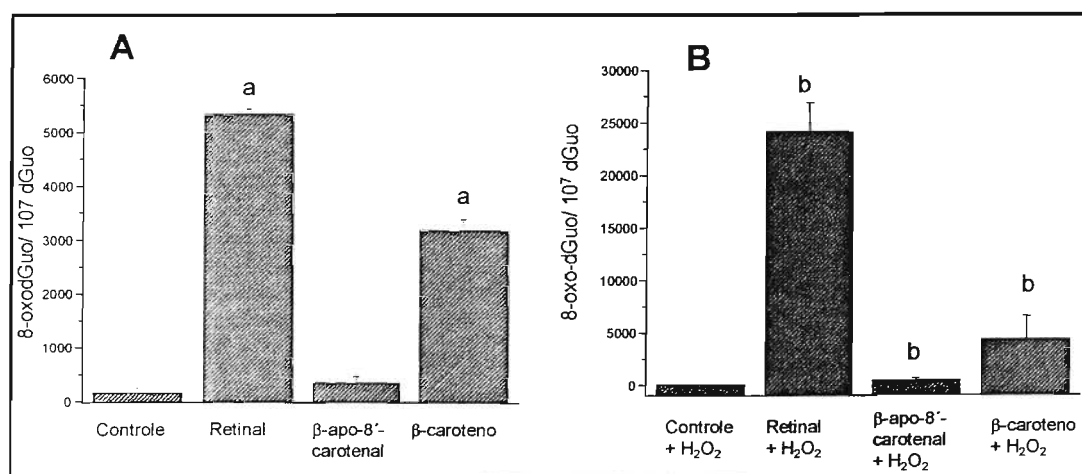


Figura 4.20: Níveis de 8-oxodGuo em dGuo tratada com carotenóides em pH 7,4.

A: incubações sem adição de H₂O₂; **B:** incubações com adição de H₂O₂ (50 mM).

^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H₂O₂ teste t (p < 0,05).

Analisando-se os dados obtidos nas tabelas 4.5 e 4.6, não foi observado em todos os tratamentos um aumento nos níveis de 8-oxodGuo nas incubações realizadas na presença do peróxido de hidrogênio comparado análises sem adição de peróxido para ambos os pHs. Isto pode ser devido a oxidação da 8-oxodGuo, já que ela apresenta um potencial de oxidação menor do que qualquer nucleosídeo natural (Burrows & Muller, 1998).

Entretanto, em todos os tratamentos, verificamos um aumento nas incubações tratadas com carotenóides em relação aos controles.

4.3.2- Quantificação das lesões em DNA de timo de bezerro promovidas por carotenóides

Experimentos para avaliar a formação das lesões 1,N²-εdGuo e 8-oxodGuo foram realizados com DNA de timo de bezerro. Os estudos foram realizados tanto na ausência quanto na presença de peróxido de hidrogênio (50 mM). A investigação do efeito de quelante de metais, neste caso a desferroxamina (0,1 mM), na formação do aduto, 1,N²-εdGuo nas incubações em pH 7,4 também foi objetivo de nosso estudo.

4.3.2.1- Quantificação de 1,N²-εdGuo em incubações entre DNA de timo de bezerro e carotenóides

As amostras de DNA incubadas com β-caroteno, retinal e β-apo-8'-carotenal após sua extração e hidrólise foram analisadas pelo nosso sistema de LC/ESI/MS-MS para detecção do eteno aduto.

Como relatado anteriormente, desenvolvemos um método sensível para a detecção do 1,N²-εdGuo em sistemas biológicos. A figura a seguir mostra a curva analítica padrão obtida para o 1,N²-εdGuo nestas análises e também um exemplo da eluição de uma amostra de DNA incubada a pH 9,4 na ausência de peróxido (Figura 4.21).

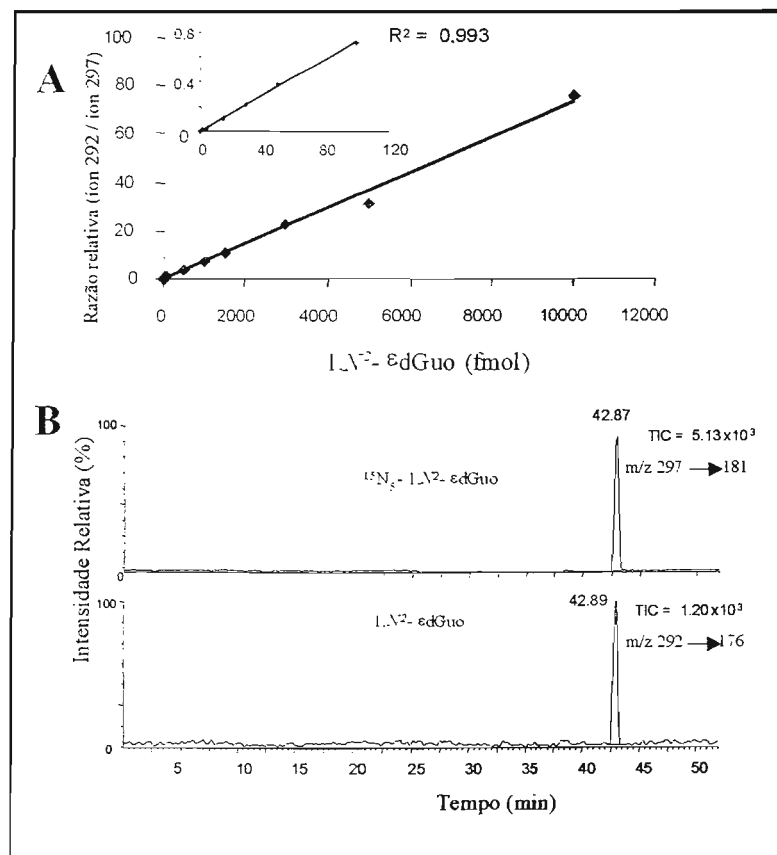


Figura 4.21: Detecção do $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de timo de bezerro. **A:** Curva de calibração do $1,N^2$ - ϵ dGuo obtida plotando-se a razão entre o (m/z 292 → 176) e a razão do padrão isotopicamente marcado $^{15}\text{N}_5$ (m/z 297 → 181) vs concentrações de $1,N^2$ - ϵ dGuo. **B:** Detecção do aduto formado em DNA controle (incubado sem H_2O_2 a pH 9,4, 37 °C, 72 h) por LC/ESI/MS-MS.

Os resultados das análises destes estudos tanto na presença como na ausência de peróxido de hidrogênio em pH 9,4 e pH 7,4, sem e com adição de desferroxamina 0,1 mM, estão mostrados nas tabelas: 4.7, 4.8 e 4.9 e figuras: 4.22, 4.23 e 4.24.

Tabela 4.7: Níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 9,4.

DNA de timo de bezerro - pH 9,4	$1,N^2$ - ϵ dGuo/ 10^7 dGuo
Controle	$5,4 \pm 1,0$
Retinal	320 ± 27^a
β - Apo-8' carotenai	1060 ± 134^a
β - Caroteno	285 ± 37^a
Controle + H_2O_2	186 ± 40
Retinal + H_2O_2	$467 \pm 70,0^b$
β - Apo-8' carotenai + H_2O_2	1284 ± 135^b
β -Caroteno + H_2O_2	1033 ± 68^b

Incubação por 72 h a 37 °C tanto na ausência como na presença de H_2O_2 (50 mM). Sendo n = 3. ^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H_2O_2 teste t ($p < 0,05$).

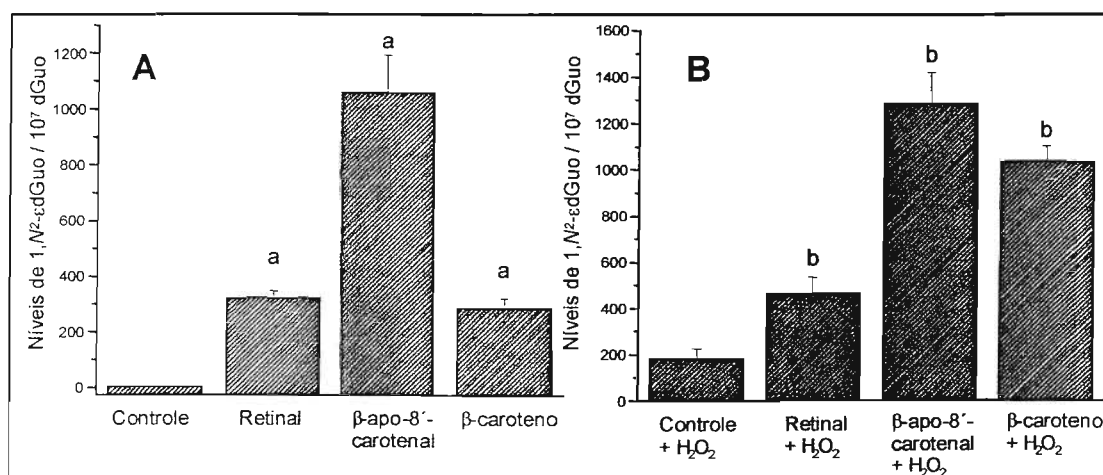


Figura 4.22: Níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 9,4. **A:** incubações sem adição de H_2O_2 ; **B:** incubações com adição de H_2O_2 (50 mM).

^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H_2O_2 teste t ($p < 0,05$).

Tabela 4.8: Níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 7,4.

DNA de timo de bezerro - pH 7,4	$1,N^2$ - ϵ dGuo/ 10^7 dGuo
Controle	$0,5 \pm 0,2$
Retinal	$8,7 \pm 1,5^a$
β - Apo-8' carotenal	$2,3 \pm 0,4^a$
β - Caroteno	$4,4 \pm 0,5^a$
Controle + H_2O_2	$3,6 \pm 0,7$
Retinal + H_2O_2	$24,5 \pm 2,1^b$
β - Apo-8' carotenal + H_2O_2	$29,2 \pm 3,2^b$
β -Caroteno + H_2O_2	$24,7 \pm 1,1^b$

Incubação a 37 °C por 72h tanto na ausência como na presença de H_2O_2 (50 mM). Sendo n = 3. ^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H_2O_2 teste t ($p < 0,05$).

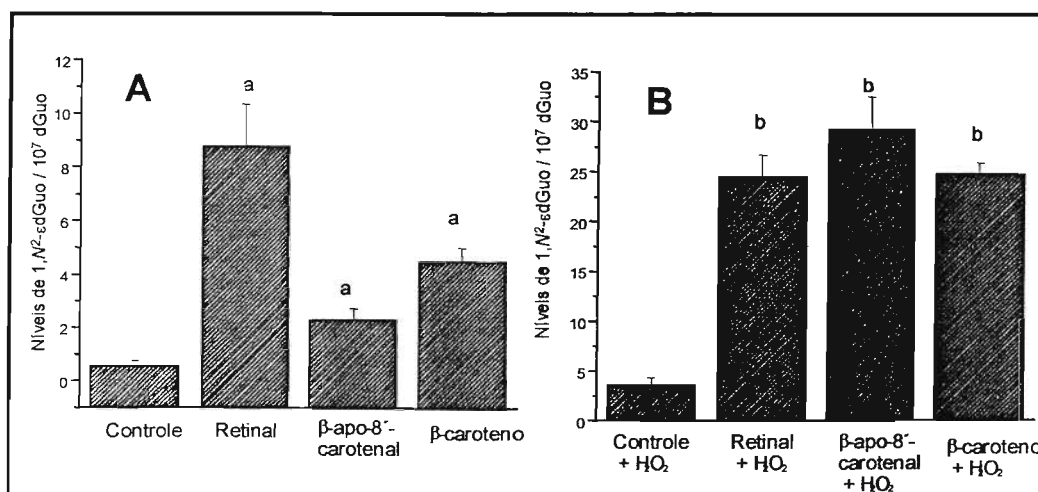


Figura 4.23: Níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 7,4. **A:** incubações sem adição de H_2O_2 ; **B:** incubações com adição de H_2O_2 (50 mM).

^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H_2O_2 teste t ($p < 0,05$).

Tabela 4.9: Níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 7,4 e adição de solução de desferroxamina (0,1 mM).

DNA de timo de bezerro - pH 7,4	$1,N^2$ - ϵ dGuo/ 10^7 dGuo
Controle	$0,7 \pm 0,1$
Retinal	$6,7 \pm 0,2^a$
β - Apo-8' carotenal	$2,6 \pm 0,3^a$
β - Caroteno	$3,9 \pm 0,4^a$
Controle + H ₂ O ₂	$5,9 \pm 2,4$
Retinal + H ₂ O ₂	$5,9 \pm 0,1$
β - Apo-8' carotenal + H ₂ O ₂	$16,1 \pm 1,2^b$
β -Caroteno + H ₂ O ₂	$15,5 \pm 5,4^b$

Incubação a 37 °C por 72h tanto na ausência como na presença de H₂O₂ (50 mM). Sendo n = 3. ^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H₂O₂ teste t ($p < 0,05$).

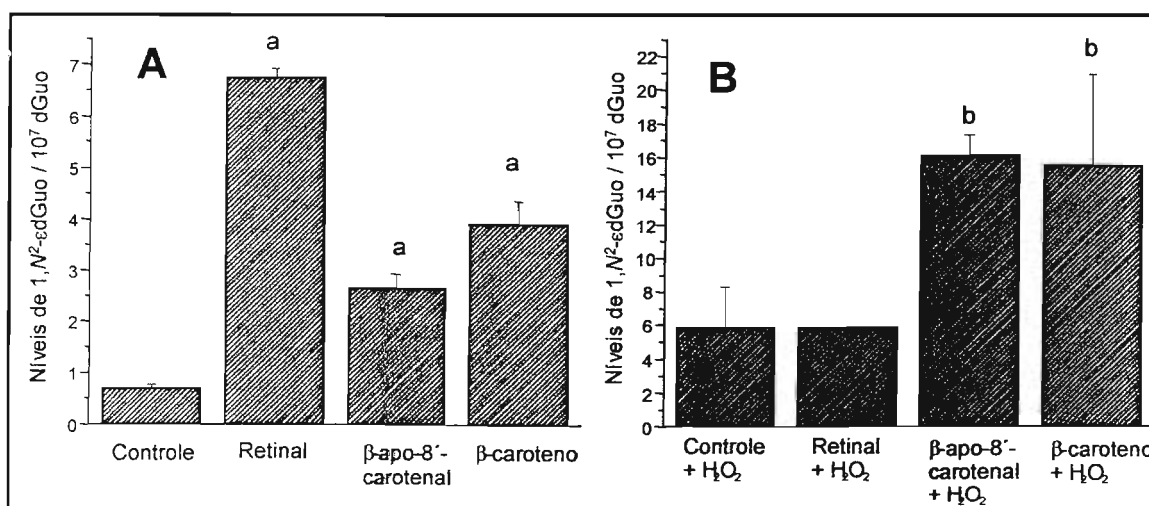


Figura 4.24: Níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 7,4 com 0,1mM de desferroxamina. **A:** incubações sem adição de H₂O₂; **B:** incubações com adição de H₂O₂ (50mM). ^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H₂O₂ teste t ($p < 0,05$).

Observamos um aumento no nível de $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA tratado com os produtos de oxidação do β -caroteno tanto nas incubações realizadas em pH 7,4 quanto para o pH 9,4. Este aumento é ainda maior em presença de peróxido, pois a oxidação provocada pelo peróxido leva à possível formação de compostos mais reativos frente a dGuo como os epóxidos dos carotenóides (Loureiro e col., 2000).

Nas incubações realizadas em pH 7,4 com solução de desferroxamina (0,1 mM), verificamos que houve um efeito inibitório na formação deste aduto (20-30%) na presença do quelante de metal (Tabela 4.9 e figura: 4.24).

4.3.2.2- Quantificação de 8-oxodGuo em incubações entre DNA de timo de bezerro e carotenóides

As amostras de DNA de timo de bezerro incubadas com carotenóides nos pHs 9,4 e 7,4 foram hidrolisadas e então analisadas por detecção eletroquímica. Os resultados obtidos estão mostrados respectivamente tabelas 4.10 e 4.11 e figuras 4.25 e 4.26.

Tabela 4.10: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 9,4.

DNA de timo de bezerro – pH 9,4	8-oxodGuo/10 ⁷ dGuo
Controle	337 ± 12
Retinal	1157 ± 62 ^a
β- Apo-8' carotenal	1697 ± 210 ^a
β- Caroteno	700 ± 71 ^a
Controle + H ₂ O ₂	6026 ± 64
Retinal + H ₂ O ₂	9728 ± 318 ^b
β- Apo-8' carotenal + H ₂ O ₂	8106 ± 638 ^b
β-Caroteno + H ₂ O ₂	6018 ± 43

Reação realizada a 37 °C por 72 h tanto na ausência como na presença de H₂O₂ (50 mM). Sendo n = 3. ^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H₂O₂ teste t (p < 0,05).

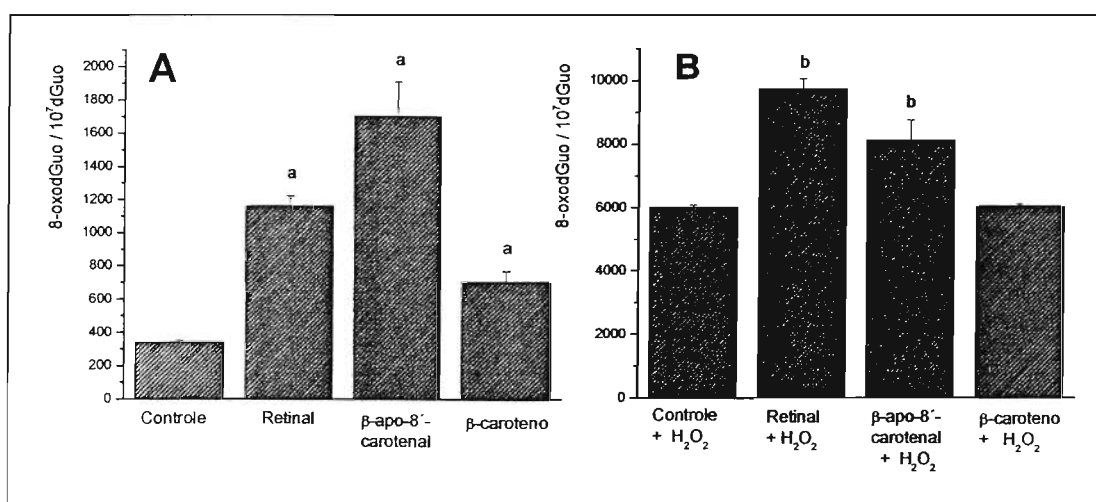


Figura 4.25: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 9,4. **A:** incubações sem adição de H₂O₂; **B:** incubações com adição de H₂O₂ (50 mM). ^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H₂O₂ teste t (p < 0,05).

Tabela 4.11: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 7,4.

DNA de timo de bezerro – pH 7,4	8-oxo dGuo/10 ⁷ dGuo
Controle	555 ± 55
Retinal	1733 ± 42 ^a
β- Apo-8' carotenal	1859 ± 10 ^a
β- Caroteno	1081 ± 57 ^a
Controle + H ₂ O ₂	20994 ± 955
Retinal + H ₂ O ₂	48495 ± 1367 ^b
β- Apo-8' carotenal + H ₂ O ₂	43500 ± 3552 ^b
β-Caroteno + H ₂ O ₂	32513 ± 2719 ^b

Reação incubada a 37 °C por 72 h tanto na ausência como na presença de H₂O₂ (50 mM). Sendo n = 3. ^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H₂O₂ teste t (p < 0,05).

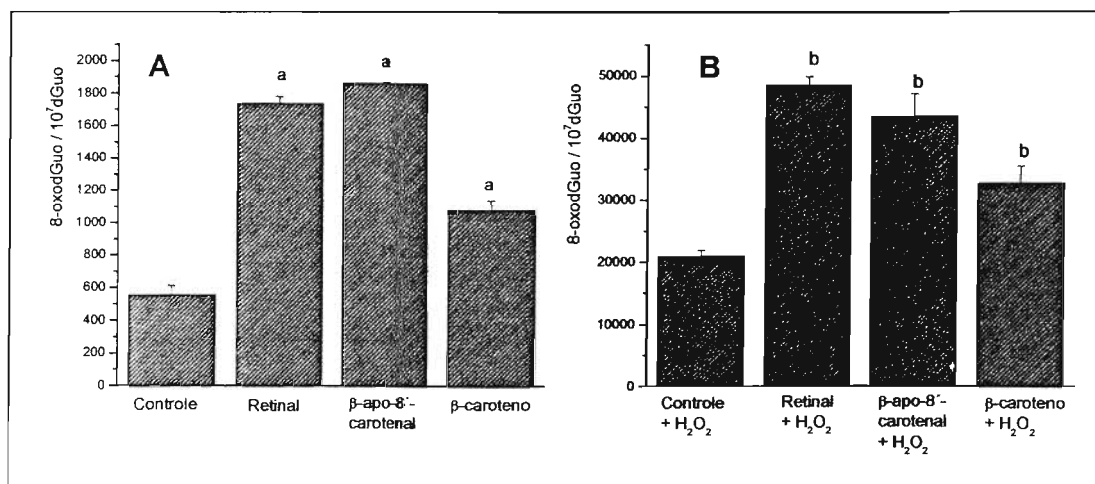


Figura 4.26: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro tratado com carotenóides em pH 7,4. **A:** incubações sem adição de H₂O₂; **B:** incubações com adição de H₂O₂ (50mM). ^a-Diferença significativa com o grupo controle. ^b-Diferença significativa com o grupo controle + H₂O₂ teste t (p < 0,05).

Quando o DNA de timo de bezerro foi incubado com os carotenóides retinal, β -apo-8'-carotenal e β -caroteno por 72 h tanto na presença como na ausência de peróxidos, verificamos um aumento significativo na formação de 8-oxodGuo no DNA tratado em relação ao controle. Este aumento é visto tanto no pH mais básico, 9.4 quanto em pH fisiológico, 7.4. (Tab. 4.11 e 4.10).

Nas incubações em presença de peróxido, observamos um aumento ainda maior nos níveis de 8-oxodGuo tanto no DNA tratado como no DNA controle. Isto é esperado, pois o peróxido de hidrogênio pode reagir com metais contaminantes do meio, como cobre e ferro (via reação de Fenton) levando à formação de radicais hidroxila, entre outras espécies radicalares, que são bastante reativas frente ao DNA, levando a formação da lesão aqui estudada. Assim, o peróxido por si só, no sistema estudado, já apresentaria um grande aumento na formação da 8-oxodGuo, como mostram os resultados obtidos nos controles tratados com peróxido em ambos os pHs.

Ressaltamos então que tanto em DNA de timo de bezerro quanto em 2'-desoxiguanosina, os produtos de oxidação do β -caroteno, levam ao aumento da formação da 8-oxodGuo e também do 1,*N*²- ϵ dGuo em ambos os pHs.

4.3.3- Lesões em sistemas celulares induzidas por carotenóides

Foram também analisados os níveis das lesões 1,*N*²-εdGuo e 8-oxodGuo em células de pulmão humano da linhagem IMR 90.

4.3.3.1- Viabilidade das células de pulmão humano frente ao β-caroteno e seus produtos de oxidação

Com o objetivo de avaliarmos a toxicidade do β-caroteno e de seus produtos de oxidação, e também para definirmos uma concentração específica destes carotenóides a serem utilizados nos estudos de detecção de lesões no DNA em células em cultura, verificamos a viabilidade desta linhagem de células (IMR 90 - fibroblastos de pulmão humano) frente aos carotenóides: β-caroteno, β-apo-8'-carotenal e retinal. Utilizamos células pulmonares para tentarmos simular como este tipo de célula poderia estar metabolizando o β-caroteno em excesso, como o recebido nos estudos ATBC e CARET (Heinonem & Albanes, 1994; Omenn e col., 1996).

Os carotenóides foram solubilizados em THF (0,25% do meio), o solvente que nos proporcionou a solubilização total de todos os carotenóides. O método utilizado neste experimento foi o ensaio do MTT (vide Materiais e Métodos item 3.10.3). A sobrevivência relativa foi usada como índice quantitativo de citotoxicidade. Definimos, a sobrevivência relativa como sendo a razão entre o número de células viáveis nas culturas expostas aos carotenóides ou ao THF e o número de células viáveis na cultura controle. Os resultados obtidos estão mostrados nas figuras 4.27 a 4.29):

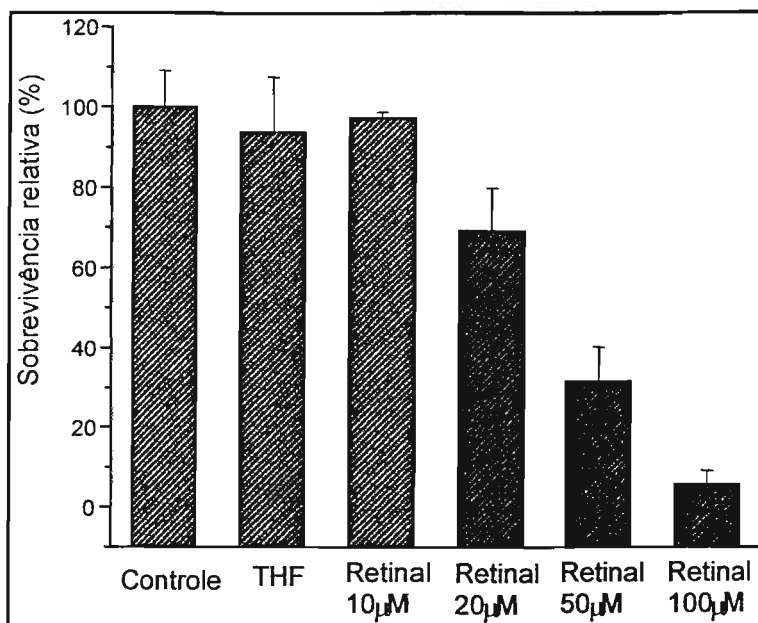


Figura 4.27: Medida de sobrevivência relativa de células IMR 90 incubadas com retinal em diferentes concentrações por 17 h. Concentração de THF no meio: 0,25% (n=3).

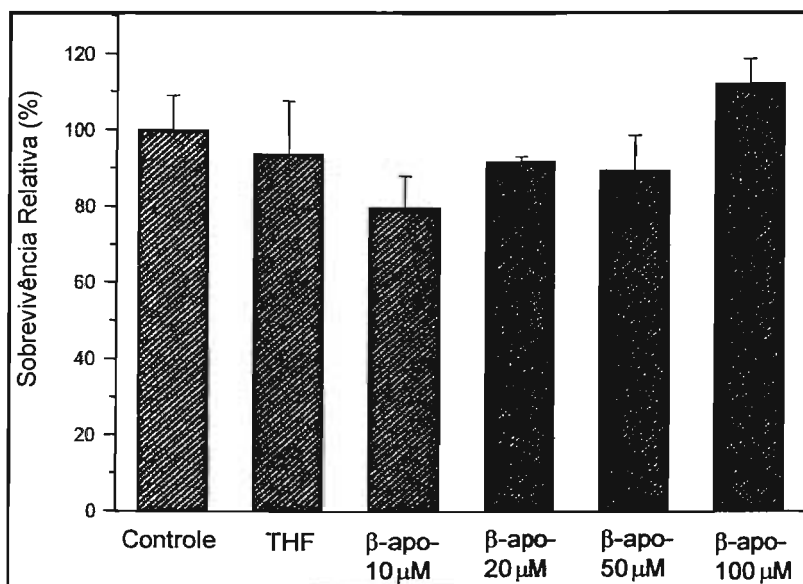


Figura 4.28: Medida de sobrevivência relativa de células IMR 90 incubadas com β -apo-8'-carotenal em diferentes concentrações por 17 h. Concentração de THF no meio: 0,25% (n=3).

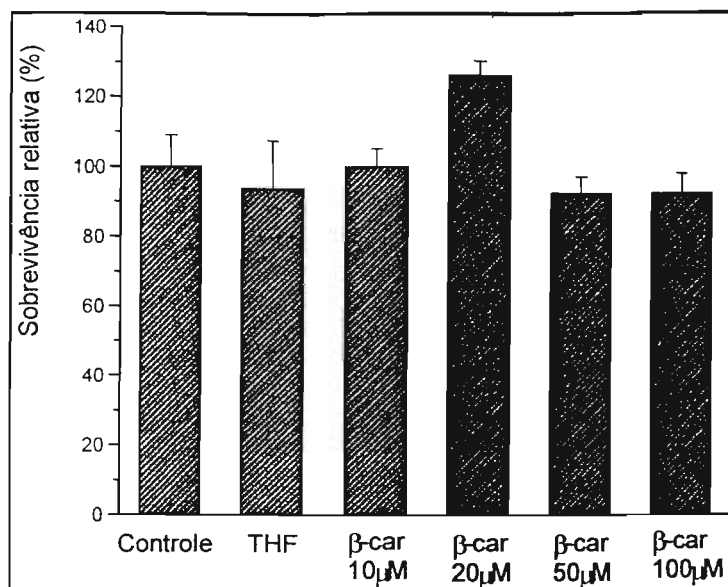


Figura 4.29: Medida de sobrevivência relativa de células IMR 90 incubadas com β -caroteno em diferentes concentrações por 17 h. Concentração de THF no meio: 0,25% (n=3).

Os dados de viabilidade obtidos mostram que o retinal (Figura 4.27) em concentrações 50 μ M e 100 μ M torna as células IMR 90 inviáveis já que mais de 70% não sobreviveram. Nos tratamentos com β -apo-8'-carotenal e β -caroteno (Figuras 4.28 e 4.29) inclusive no controle com THF, a mortalidade foi inferior a 70% mostrando que as células são resistentes ao tratamento e que o THF na concentração utilizada (0,25% do meio) não é citotóxico, não interferindo assim no tratamento com as drogas.

Esses resultados nos possibilitaram conhecer as concentrações que podem ser utilizadas e que fornecem uma alta porcentagem de células viáveis após o período de tratamento e extração de DNA celular. Sendo assim, realizamos os tratamentos desta linhagem de células com concentração de 20 μ M destes mesmos carotenóides. Esta concentração apresentou viabilidade celular superior a 70% após o tratamento e também conferiu maior solubilidade no meio. Em concentrações superiores, foi observado uma "leve" precipitação do β -apo-8'-carotenal e do β -caroteno quando adicionados ao meio de cultura.

4.3.3.2- Detecção e quantificação de 1,N²-εdGuo em células de pulmão humano tratadas com β-caroteno e seus produtos de oxidação

Uma vez que definimos a concentração de carotenóides a serem utilizadas no tratamento com células (20 μM), estas foram tratadas por 17 h (vide Materiais e Métodos item 3.10.4). Após terem seu DNA extraído e hidrolisado, as amostras foram analisadas por LC/ESI/MS-MS para a detecção de 1,N²-εdGuo neste sistema. Os resultados estão mostrados na tabela 4.12 e na figura 4.30.

Tabela 4.12: Níveis de 1,N²-εdGuo em DNA de células de pulmão humano (IMR90) tratadas com β-caroteno e seus produtos de oxidação (20 μM) por 17 h.

DNA de células de pulmão humano	1,N ² -εdGuo/10 ⁷ dGuo
Controle	1,9 ± 0,3
THF	5,7 ± 0,7 ^a
Retinal	14,3 ± 4,1 ^b
β-apo-8'-carotenal	12,9 ± 0,9 ^b
β- Caroteno	9,8 ± 1,8 ^b

Sendo n = 3. ^a-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao controle; ^b-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao THF; teste t (p < 0,05).

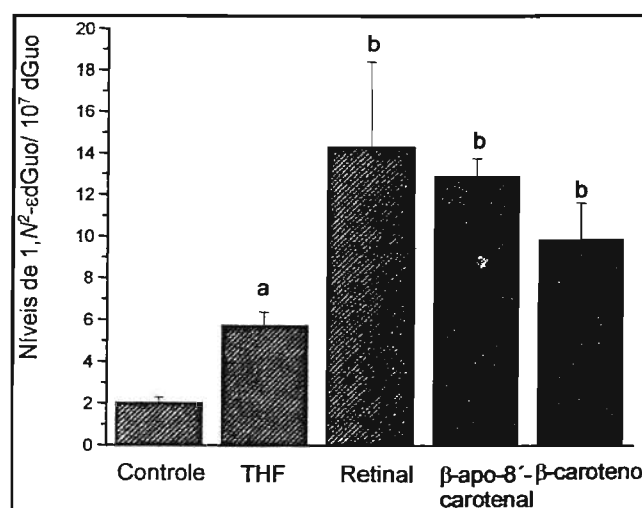


Figura 4.30: Níveis de 1,N²-εdGuo em DNA de células de pulmão humano, IMR 90, com β-caroteno e seus produtos de oxidação (20 μM) por 17 h. Sendo n = 3. ^a-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao controle; ^b-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao THF teste t; (p < 0,05).

Os dados obtidos (tabela 4.12 e figura 4.30) indicam que tanto o β-caroteno, quanto o retinal e β-apo-8'-carotenal levaram a um aumento no nível de aduto destas células comparados ao seu veículo, o THF. O THF também apresentou um aumento no nível do aduto comparado ao controle; entretanto, os

valores obtidos nos tratamentos com os carotenóides comprovam o efeito desta classe de composto neste tipo de lesão.

4.3.3.3- Detecção e quantificação da 8-oxodGuo em células de pulmão humano tratadas com β -caroteno e seus produtos de oxidação

As amostras de células tratadas com carotenóides (20 μ M / 17 h) também foram submetidas à análise para verificar a formação de 8-oxodGuo em seu DNA. Assim, o DNA extraído foi hidrolisado e analisado por HPLC acoplado à detecção eletroquímica. Os resultados estão mostrados na tabela 4.13 e na figura 4.31.

Tabela 4.13: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de células de pulmão humano (IMR90) tratadas com β -caroteno e seus produtos de oxidação (20 μ M) por 17 h.

DNA Células IMR 90	8-oxodGuo / 10^7 dGuo
Controle	39,0 \pm 6,8
THF	35,6 \pm 4,0
Retinal	139,3 \pm 33,7 ^a
β -apo-8'-carotenal	52,1 \pm 4,0 ^a
β -caroteno	60,9 \pm 3,7 ^a

Sendo n = 3. ^a-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao THF; teste t; ($p < 0,05$).

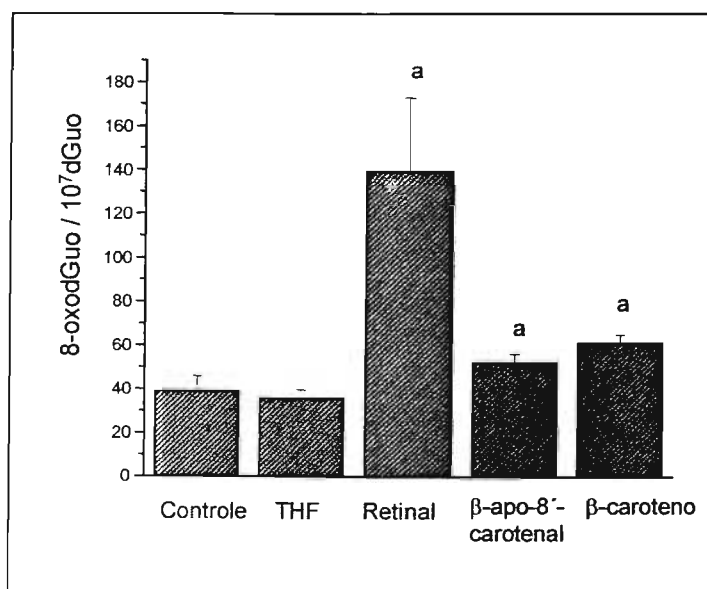


Figura 4.31: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de células de pulmão humano, IMR 90, com β -caroteno e seus produtos de oxidação (20 μ M) por 17 h. Sendo n = 3. ^a-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao THF teste t; ($p < 0,05$).

Os dados mostraram que o tratamento com carotenóides também levou a uma indução na formação de 8-oxodGuo em DNA de células de pulmão humano (Tabela 4.13 e figura 4.31). Os níveis obtidos para o DNA tratado foi estatisticamente significativo comparado ao grupo THF. O THF não levou a um aumento na formação da lesão comparado ao grupo controle.

Assim, em sistemas celulares o β -caroteno e alguns de seus produtos de oxidação como o retinal e o β -apo-8'-carotenal, levaram a uma indução na formação do aduto 1, N^2 - ϵ dGuo e também da 8-oxodGuo.

4.4- Biodisponibilidade do β -caroteno e do licopeno

Em colaboração com o Dr. Humberto Reis Matos, na época pós-graduando do nosso laboratório, realizamos experimentos de verificação da biodisponibilidade do β -caroteno e do licopeno. Parte dos experimentos foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Joel Heimann e seu aluno na época dos experimentos, Dr. Alexandre Silva da Faculdade de Medicina da USP (FM-USP).

Nos animais, administrou-se 10 mg de β -caroteno ou licopeno *i.p.* (vide Materiais e Métodos item 3.11). Alíquotas de sangue após 3 h, 6 h, 9 h e 24 h da administração dos carotenóides foram retiradas dos animais. O plasma do sangue coletado foi analisado por HPLC (vide Materiais e Métodos item 3.2.2 – Sistema 6) (Riso e col, 1999).

Os cromatogramas obtidos a partir das análises das misturas de plasma sanguíneo dos animais suplementados com β -caroteno e com licopeno estão mostrados a seguir (Figura 4.32).

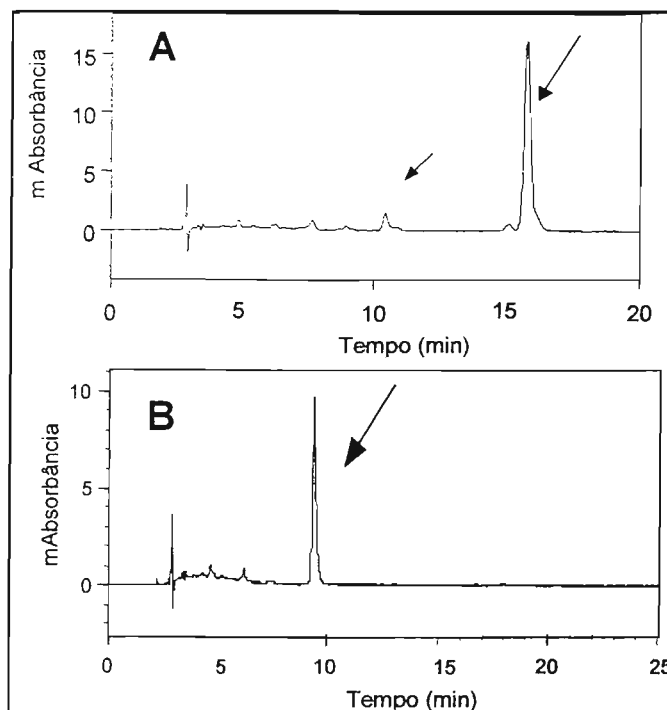


Figura 4.32: Cromatogramas obtidos por HPLC (Materiais e métodos item 3.2.2; sistema 6) a partir do plasma sanguíneo de ratos suplementados. **A** Suplementação com β -caroteno. **B** Suplementação com licopeno; (o licopeno aparece em 9-10 min e o β -caroteno em 15 min). Detecção por HPLC/UV em 445 nm.

Após a quantificação dos carotenóides por HPLC, obtivemos a biodisponibilidade dos carotenóides durante um período de 24 h (Figura 4.33). O nível plasmático mais elevado de β -caroteno no plasma, foi de $4,05 \pm 0,84$ nmol/mL de sangue e foi atingido após 6 h da aplicação. Este nível foi mantido por mais 3 h (Figura 4.33 A). Os ratos que receberam a mesma concentração de licopeno apresentaram uma concentração plasmática deste carotenóide quatro vezes menor ($0,97 \pm 0,16$ nmol/mL de sangue) que os animais tratados com β -caroteno (Figura 4.33 B). O nível máximo de licopeno no plasma foi observado após 3 h da inoculação. Nos animais controle, ou seja, os que não receberam tratamento com carotenóides, não foi possível detectar níveis plasmáticos destes carotenóides. Sendo assim, a concentração de carotenóides utilizadas em nossos estudos aumentou efetivamente os níveis plasmáticos das espécies analisadas.

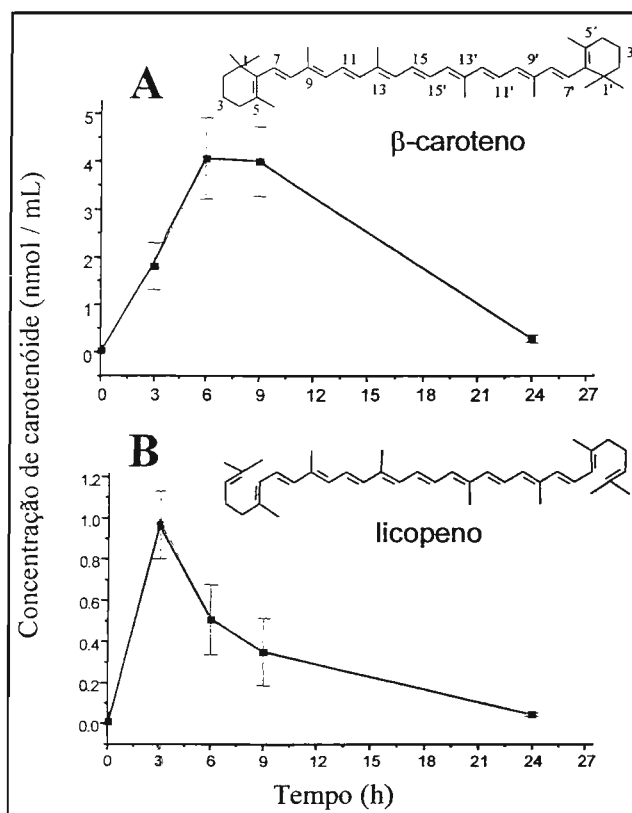


Figura 4.33: Biodisponibilidade do β -caroteno e do licopeno no plasma sanguíneo de animais tratados com 10 mg destes carotenóides.

4.5- Lesões em DNA *in vivo*

4.5.1- Detecção e quantificação de $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de pulmão de animais suplementados com β -caroteno e expostos à fumaça de cigarro

Após verificarmos a formação do aduto em sistemas biológicos *in vitro* e em sistemas celulares, realizamos estudos piloto em sistemas *in vivo*. Assim, com base nos estudos ATBC e CARET (Heinonen & Albanes, 1994; Omenn e col., 1996) que indicaram um efeito deletério do β -caroteno em fumantes, suplementamos animais com este carotenóide expondo-os à fumaça de cigarro. Ressaltamos que o nosso biotério não dispõe de área para estudos com animais que necessitem de atmosfera diferente. Desta forma, os animais tiveram que ser mantidos em sala no nosso laboratório. Assim, fomos obrigados a reduzir o número de animais nos grupos estudados. Os estudos foram realizados por 7, 30

e 180 dias (vide Materiais e Métodos item 3.12). Os resultados estão apresentados nas tabelas: 4.14, 4.15 e 4.16 e figuras 4.34, 4.35 e 4.36.

Tabela 4.14: Níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β -caroteno e fumaça de cigarro por 7 dias.

DNA de pulmão de rato - 7 dias	$1,N^2$ - ϵ dGuo/ 10^9 dGuo
Controle	$50,8 \pm 7,0$
Veículo	$38,0 \pm 8,9^a$
β - Caroteno	$99,4 \pm 23,8^b$
Fumaça	$63,1 \pm 13,9$
Fumaça + β - Caroteno	$144,4 \pm 55,4^c$

Sendo $n = 4-6$. ^a-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao controle; ^b-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao veículo; ^c-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao grupo fumaça; teste t ($p < 0,05$).

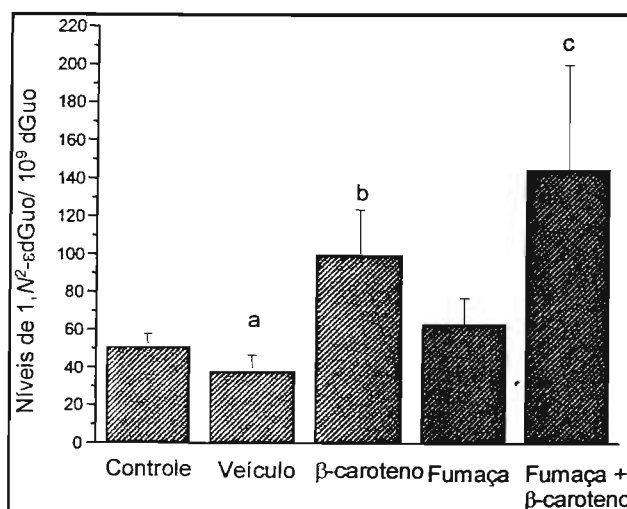


Figura 4.34: Níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β -caroteno e fumaça de cigarro por 7 dias. Sendo $n = 4-6$. ^a-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao controle; ^b-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao veículo; ^c- indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao grupo fumaça (teste t $p < 0,05$).

Tabela 4.15: Níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β -caroteno e fumaça de cigarro por 30 dias.

DNA de pulmão de ratos – 30 dias	$1,N^2$ - ϵ dGuo/ 10^9 dGuo
Controle	$81,0 \pm 13,1$
Veículo	$60,7 \pm 10,7^a$
β - Caroteno	$79,8 \pm 13,3^b$
Fumaça	$68,4 \pm 9,1$
Fumaça + β - Caroteno	$58,8 \pm 10,7^d$

Sendo $n = 4-6$. ^a-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao controle; ^b-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao veículo; ^d-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao β -caroteno teste t; ($p < 0,05$).

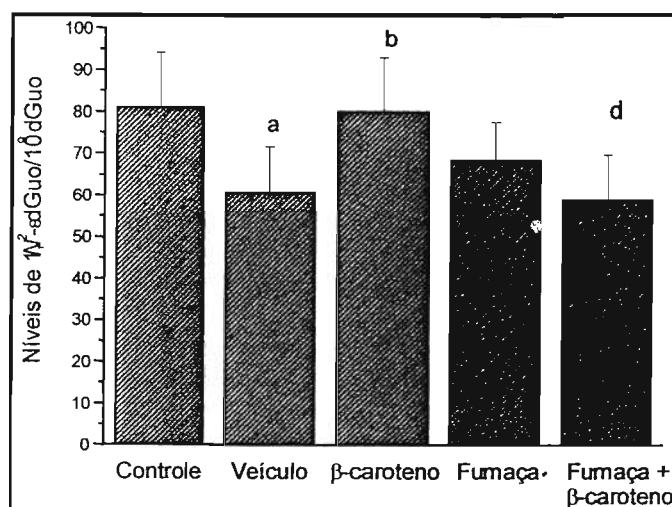


Figura 4.35: Níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β -caroteno e fumaça de cigarro por 30 dias. Sendo $n = 4-6$. ^a-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao controle; ^b-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao veículo; ^d-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao β -caroteno teste t; ($p < 0,05$).

Tabela 4.16: Níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β -caroteno e fumaça de cigarro por 180 dias.

DNA de pulmão de ratos – 180 dias	$1,N^2$ - ϵ dGuo/ 10^9 dGuo
Controle	$56,9 \pm 9,6$
Veículo	$87,1 \pm 11,9^a$
β - Caroteno	$144,7 \pm 31,5^b$
Fumaça	$99,5 \pm 5,7^a$
Fumaça + β - Caroteno	$136,0 \pm 21,1^c$

Sendo $n = 4 - 6$. ^a-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao controle.

^b-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao grupo veículo.

^c-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao grupo fumaça.

Teste t ($p < 0,05$).

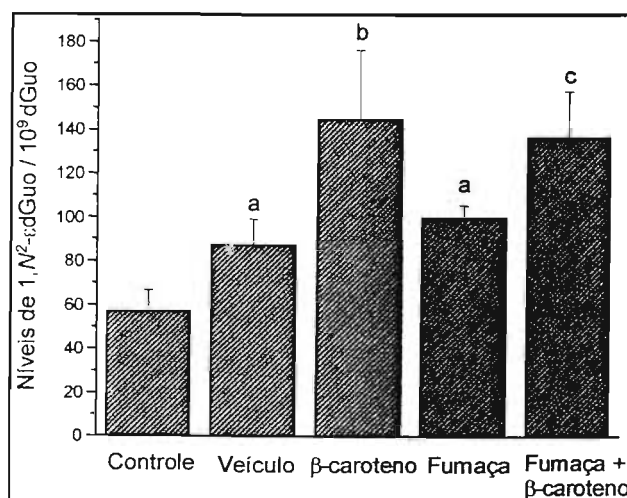


Figura 4.36: Níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β -caroteno e fumaça de cigarro por 180 dias. Sendo $n = 4-6$. ^a-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao controle; ^b-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao veículo; ^c-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao grupo fumaça; teste t ($p < 0,05$).

Níveis significativamente elevados de $1,N^2$ - ϵ dGuo foram detectados em animais suplementados com β -caroteno por 7, 30 e 180 dias (tabelas: 4.14 a 4.16 e figuras 4.34 a 4.36) quando comparados ao grupo tratado com veículo. Um dado interessante é que os tecidos e o DNA dos animais suplementados com β -caroteno apresentaram coloração avermelhada, típica de carotenóide, fato não observado nos animais controle.

Quando comparamos os grupos expostos à fumaça de cigarro e grupo controle, observamos aumento significativo apenas no grupo exposto por 180 dias. É interessante notar, uma tendência de aumento no nível deste aduto, não significativa, após apenas 7 dias de exposição à fumaça de cigarro, que não foi observada na exposição mais prolongada, 30 dias.

A comparação entre os grupos expostos à fumaça de cigarro e o grupo suplementado com o carotenóide e exposto à fumaça de cigarro mostrou aumento significativo de $1,N^2$ - ϵ dGuo nos animais tratados por 7 e 180 dias. Entretanto, não observamos, com esse tipo de tratamento, um efeito sinérgico da exposição à fumaça associada à suplementação com β -caroteno quando comparamos os grupos com suplementação de β -caroteno e suplementação associada à fumaça de cigarro. Apenas no grupo tratado por 7 dias foi observada uma tendência de aumento, mas não significativa estatisticamente. Os grupos tratados por 30 e 180 dias, mostraram uma diminuição dos níveis da lesão comparando-se os dois grupos, porém só no tratamento de 30 dias esta diminuição foi significativa.

4.5.2. – Detecção e quantificação de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de animais suplementados com β -caroteno e expostos à fumaça de cigarro

As amostras de DNA de pulmão dos animais tratados por 7, 30 e 180 dias também foram analisadas quanto à presença de 8-oxodGuo. Os dados obtidos para os tratamentos estão mostrados nas tabelas 4.17 a 4.18 e figuras 4.37 a 4.39.

Tabela 4.17- Níveis de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β -caroteno e fumaça de cigarro por 7 dias.

DNA de pulmão de ratos – 7 dias	8-oxodGuo/ 10^7 dGuo
Controle	46,6 \pm 9,8
Veículo	31,0 \pm 8,0
β -caroteno	53,7 \pm 1,3 ^b
Fumaça	35,4 \pm 13,9
Fumaça + β -caroteno	30,4 \pm 7,5 ^d

Sendo n = 4 - 6. ^b-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao veículo; ^d-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao grupo β -caroteno; teste t ($p < 0,05$).

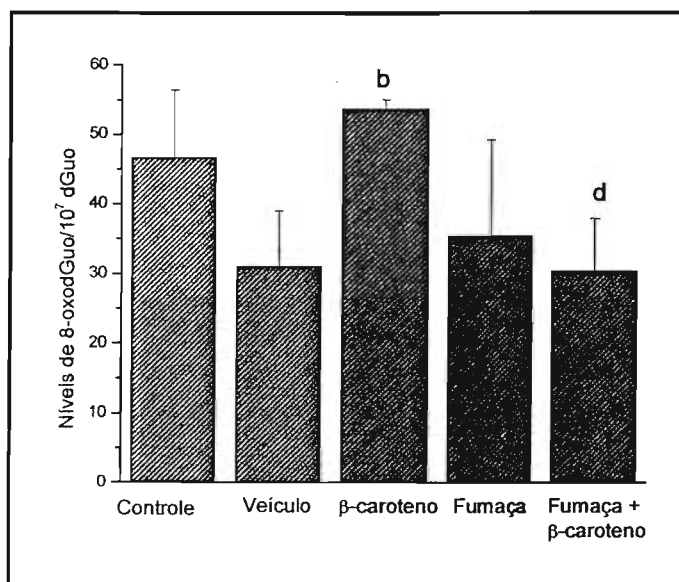


Figura 4.37: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β -caroteno e fumaça de cigarro por 7 dias. Sendo n = 4-6. ^b-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao veículo; ^d-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao grupo β -caroteno; teste t; ($p < 0,05$).

Tabela 4.18- Níveis de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β -caroteno e fumaça de cigarro por 30 dias.

DNA de pulmão de ratos – 30 dias	8-oxodGuo/ 10^7 dGuo
Controle	43,9 \pm 4,3
Veículo	59,0 \pm 16,5
β -caroteno	38,4 \pm 7,6 ^b
Fumaça	36,4 \pm 4,5 ^a
Fumaça + β -caroteno	28,5 \pm 2,9 ^{c,d}

Sendo n = 4 - 6. ^a-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao controle; ^b-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao veículo; ^c-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao grupo fumaça; ^d-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao grupo β -caroteno; teste t (p < 0,05).

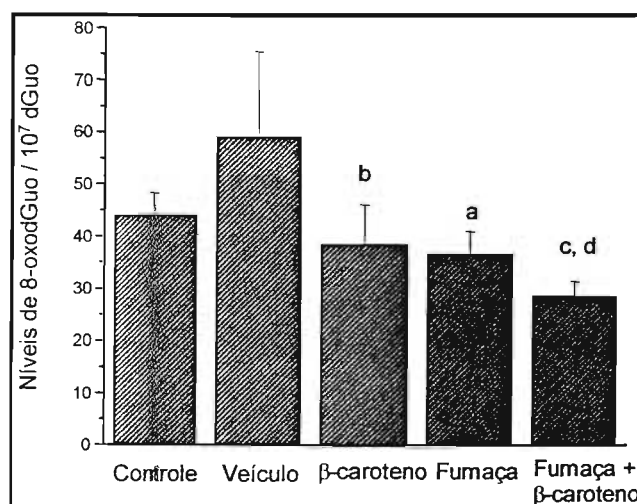


Figura 4.38: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β -caroteno e fumaça de cigarro por 30 dias. Sendo n = 4-6. ^a-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao controle; ^b-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao grupo veículo; ^c-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao grupo fumaça; ; ^d-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao grupo β -caroteno; (teste t p < 0,05).

Tabela 4.19- Níveis de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β -caroteno e fumaça de cigarro por 180 dias.

DNA de pulmão de ratos – 180 dias	8-oxodGuo/ 10^7 dGuo
Controle	$85,5 \pm 17,1$
Veículo	$87,7 \pm 32,4$
β -caroteno	$236,3 \pm 16,1^b$
Fumaça	$83,5 \pm 7,3$
Fumaça + β -caroteno	$106,5 \pm 10,8^{c, d}$

Sendo $n=4 - 6$. ^b-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao veículo; ^c-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao fumaça; ^d-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao grupo β -caroteno; teste t ($p < 0,05$).

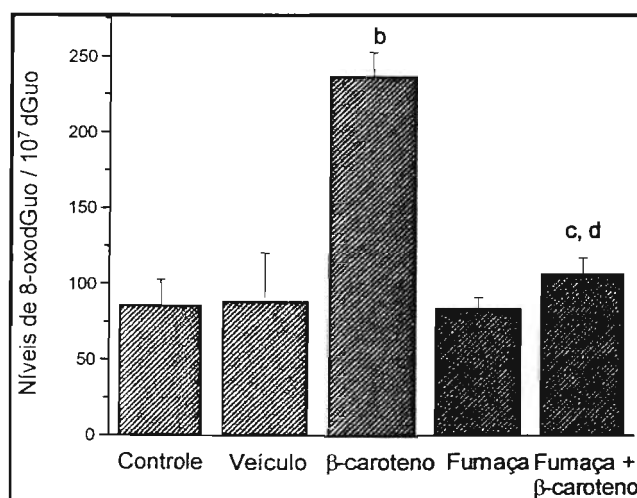


Figura 4.39: Níveis de 8-oxodGuo em DNA de pulmão de ratos tratados com β -caroteno e fumaça de cigarro por 180 dias. Sendo $n = 4-6$. ^b-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao veículo; ^c-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao fumaça; ^d-indica que o resultado é estatisticamente significativo frente ao grupo β -caroteno; (teste t $p < 0,05$).

Os grupos suplementados por 7 e 180 dias com β -caroteno (tabelas 4.17 e 4.19 e figuras 4.37 e 4.39) apresentaram aumentos significativo nos níveis de 8-oxodGuo. No tratamento por 30 dias (tabela 4.18 e figura 4.38), observamos uma redução significativa nos níveis desta lesão.

Na comparação dos grupos expostos à fumaça de cigarro com o grupo controle, não observamos nenhum efeito nesta lesão nos grupos expostos por 7 e 180 dias. Surpreendentemente, observamos redução desta lesão no grupo exposto por 30 dias.

Observamos uma pequena diminuição nos níveis de 8-oxodGuo entre os grupos expostos à fumaça por 7 e 30 dias comparado aos grupos suplementados com β -caroteno e expostos à fumaça de cigarro. Entretanto, após 180 dias de exposição à fumaça associada à suplementação com o carotenóide, os níveis de 8-oxodGuo mostraram-se significativamente aumentados frente ao grupo exposto somente à fumaça de cigarro.

Novamente, não observamos efeito sinérgico da fumaça com o β -caroteno, uma vez que os grupos apenas suplementados com o carotenóide quando comparado aos grupos suplementados e expostos à fumaça apresentaram redução significativa desta lesão.

4.6 - Experimentos para verificação da comunicação intercelular via junções comunicantes (Gap junctional communication) induzida por produtos de oxidação do β -caroteno e da zeaxantina

Os experimentos de verificação da comunicação intercelular via junções comunicantes foram realizados durante o período de estágio na Heinrich Heine Universität em Düsseldorf (Alemanha) com o grupo do Professor W. Stahl (entre agosto e outubro de 2002). As medidas aqui realizadas tiveram a colaboração da estudante de doutorado na época, Niloofar Ale-Agha.

É conhecido da literatura que os carotenóides aumentam a comunicação intercelular via junções comunicantes (Hossain e col., 1993; Zhang e col., 1991; Stahl e col., 2000). Sendo esta na verdade, uma das propriedades antioxidantes dos carotenóides, é interessante investigar como os produtos de oxidação desses compostos se comportam frente a esta propriedade. Estes dados têm relevância para os nossos estudos sobre atividade pró e antioxidante do β -caroteno e podem contribuir para explicar o “paradoxo” deste carotenóide descrito na introdução (vide Introdução item 1.3.8). Como este tipo de investigação era de comum interesse do nosso grupo na Universidade de São Paulo e do grupo do Prof. Stahl, iniciamos estes experimentos, uma vez que o grupo do Prof. Stahl tem experiência nas técnicas necessárias (Ale-Agha e col., 2002). As células (WB F344) foram tratadas com os produtos de oxidação do β -caroteno e da zeaxantina por um período de 24 e de 72 horas (vide Materiais e Métodos 3.13.3). Após este período, as células foram levadas ao microscópio para a injeção do corante (Lucifer yellow) e foram realizadas medidas das junções comunicantes. Os resultados obtidos em experimentos realizados tanto para o período de 24 como para o período de 72 horas estão mostrados nas figuras 4.40 e 4.41.

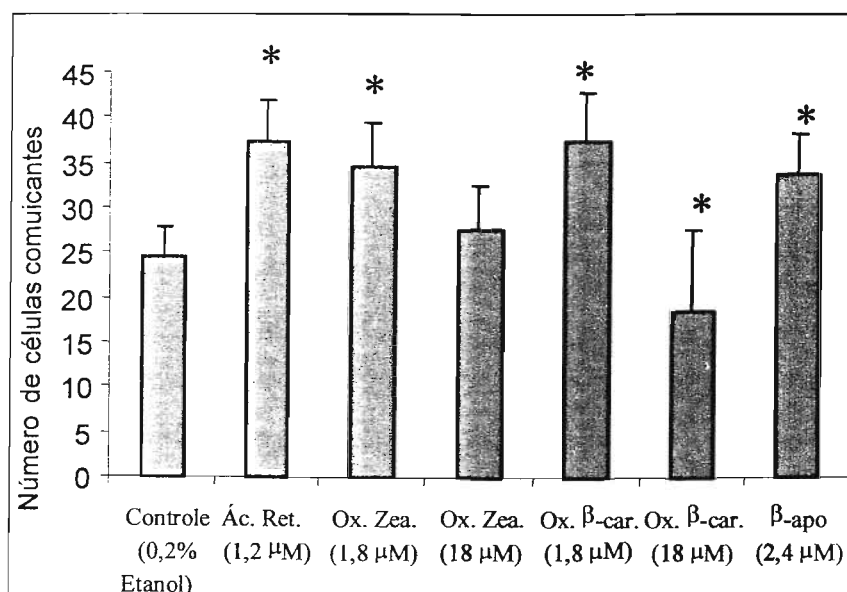


Figura 4.40: Efeito dos metabólitos de carotenóides nas junções comunicantes intercelulares após tratamento de 24 h. *-indica que o resultado é estatisticamente significativo comparado ao grupo controle; teste t ($p < 0.001$). Legenda: Ac. Ret.: ácido retinóico; Ox. Zea: zeaxantina oxidada; Ox. β-car: β-caroteno oxidado; β-apo: β-apo-8'-carotenal (vide Materiais e Métodos itens 3.13.1 e 3.13.3).

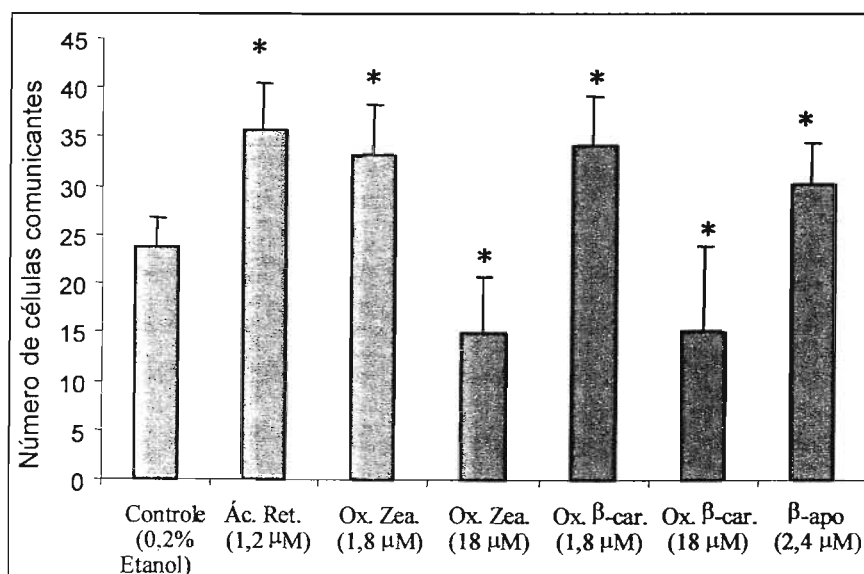


Figura 4.41: Efeitos dos metabólitos dos carotenóides nas junções comunicantes intercelulares após tratamento de 72 h. *-indica que o resultado é estatisticamente significativo comparado ao grupo controle; teste t ($p < 0.001$). Legenda: Ac. Ret.: ácido retinóico; Ox. Zea: zeaxantina oxidada; Ox. β-car: β-caroteno oxidado; β-apo: β-apo-8'-carotenal (vide Materiais e Métodos itens 3.13.1 e 3.13.3).

O tratamento com os produtos de oxidação dos carotenóides em baixa concentração (1,8 μM) e também com β -apo-8'-carotenal levaram a um aumento no número de células comunicantes comparado com os valores obtidos para o controle, tanto para o tratamento de 24 h quanto para o tratamento de 72 horas. Já quando adicionamos uma alta concentração destes produtos (18 μM), o número de células comunicantes diminui (Figura 4.40 e 4.41). O ácido retinóico que foi utilizado como controle positivo, como era esperado, também levou ao aumento no número de células comunicantes. Estes dados indicam que os metabólitos dos carotenóides aqui estudados desempenham a mesma atividade antioxidante que os carotenóides que os originam, quando em pequenas concentrações. Vale salientar, que foram utilizadas misturas dos produtos obtidos; é possível que apenas alguns dos compostos sejam realmente responsáveis por este efeito. Dentre os metabólitos que são obtidos na oxidação do β -caroteno, o único disponível na forma pura no laboratório era o β -apo-8'-carotenal que, como já mencionado, também levou a um aumento no número de células comunicantes.

Novos experimentos foram realizados com o objetivo de comparar os produtos de oxidação com os carotenóides que originaram estes produtos, β -caroteno e zeaxantina na mesma concentração (1,8 μM). Para isto tivemos que alterar todo o padrão de controles que havíamos utilizado anteriormente, devido a baixa solubilidade do β -caroteno e da zeaxantina em etanol. O solvente utilizado foi o THF (tetrahidrofurano) para a solução estoque e depois diluições em etanol e posteriormente a diluição também em etanol no meio de cultura das células. Os resultados obtidos para estes experimentos estão apresentados nas figuras 4.42 e 4.43.

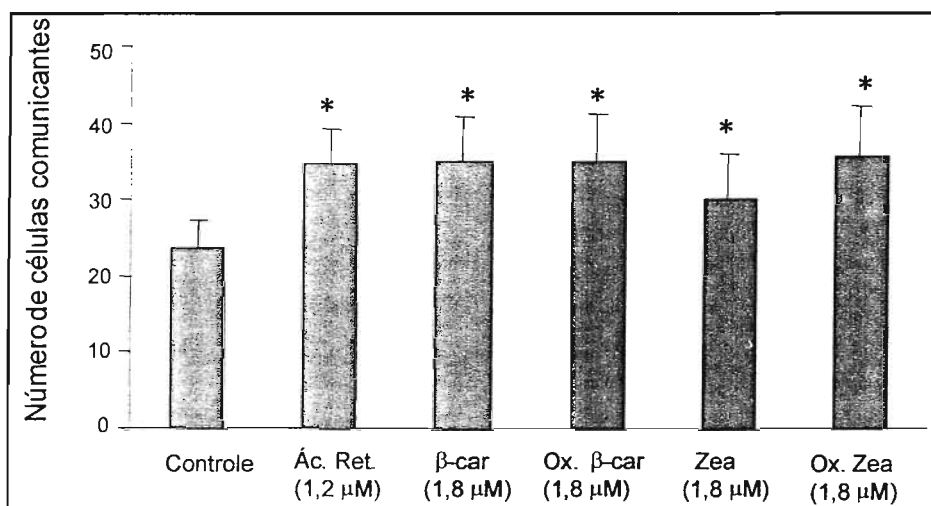


Figura 4.42: Comparação dos efeitos do β -caroteno, zeaxantina e seus metabólitos nas junções comunicantes intercelulares após tratamento de 24 h. *-indica que o resultado é estatisticamente significativo comparado ao grupo controle; teste t ($p < 0.001$). Legenda: Ac. Ret.: ácido retinóico; Ox. Zea: zeaxantina oxidada; Ox. β -car: β -caroteno oxidado; β -apo: β -apo-8'-carotenal (vide Materiais e Métodos itens 3.13.1 e 3.13.3).

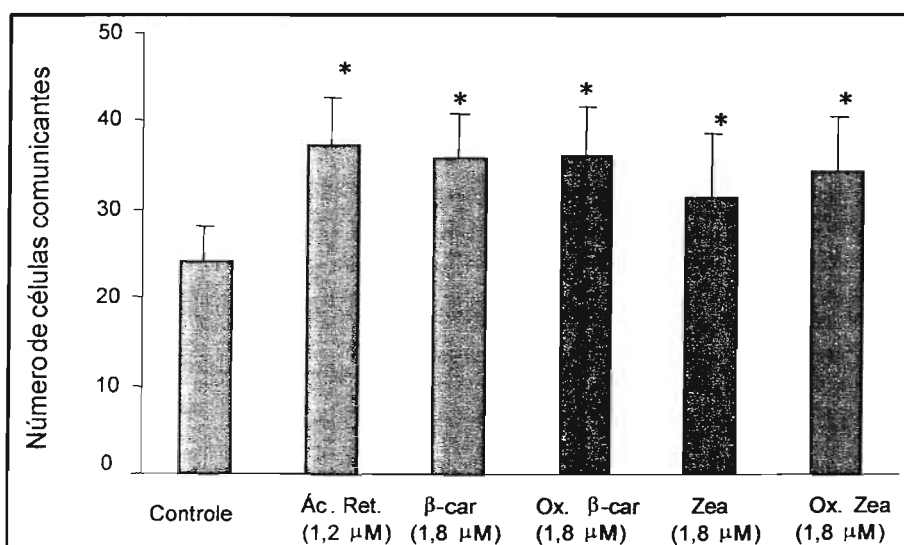


Figura 4.43: Comparação dos efeitos do β -caroteno, zeaxantina e seus metabólitos nas junções comunicantes intercelulares após tratamento de 72 h. *-indica que o resultado é estatisticamente significativo comparado ao grupo controle; teste t ($p < 0.001$). Legenda: Ac. Ret.: ácido retinóico; Ox. Zea: zeaxantina oxidada; Ox. β -car: β -caroteno oxidado; β -apo: β -apo-8'-carotenal (vide Materiais e Métodos itens 3.13.1 e 3.13.3).

Analisando-se os resultados das figuras 4.42 e 4.43 verificamos que os produtos de oxidação do β -caroteno e o próprio β -caroteno mostraram uma indução do número de células comunicantes parecida com a de seus metabólitos, mostrando que nesta concentração a atividade antioxidante é equivalente. Já os produtos de oxidação da zeaxantina parecem levar a uma indução ligeiramente maior no número de comunicação celular medido por este ensaio que a própria zeaxantina em ambos os tratamentos. Entretanto, a diferença entre o resultado obtido para os produtos de oxidação da zeaxantina e a própria zeaxantina, após o tratamento de 72 h, não é estatisticamente significativa.

A seguir, estão ilustradas algumas das fotos obtidas no ensaio da comunicação intercelular via junções comunicantes para o tratamento pelo período de 72 h (Figuras 4.44 e 4.45).

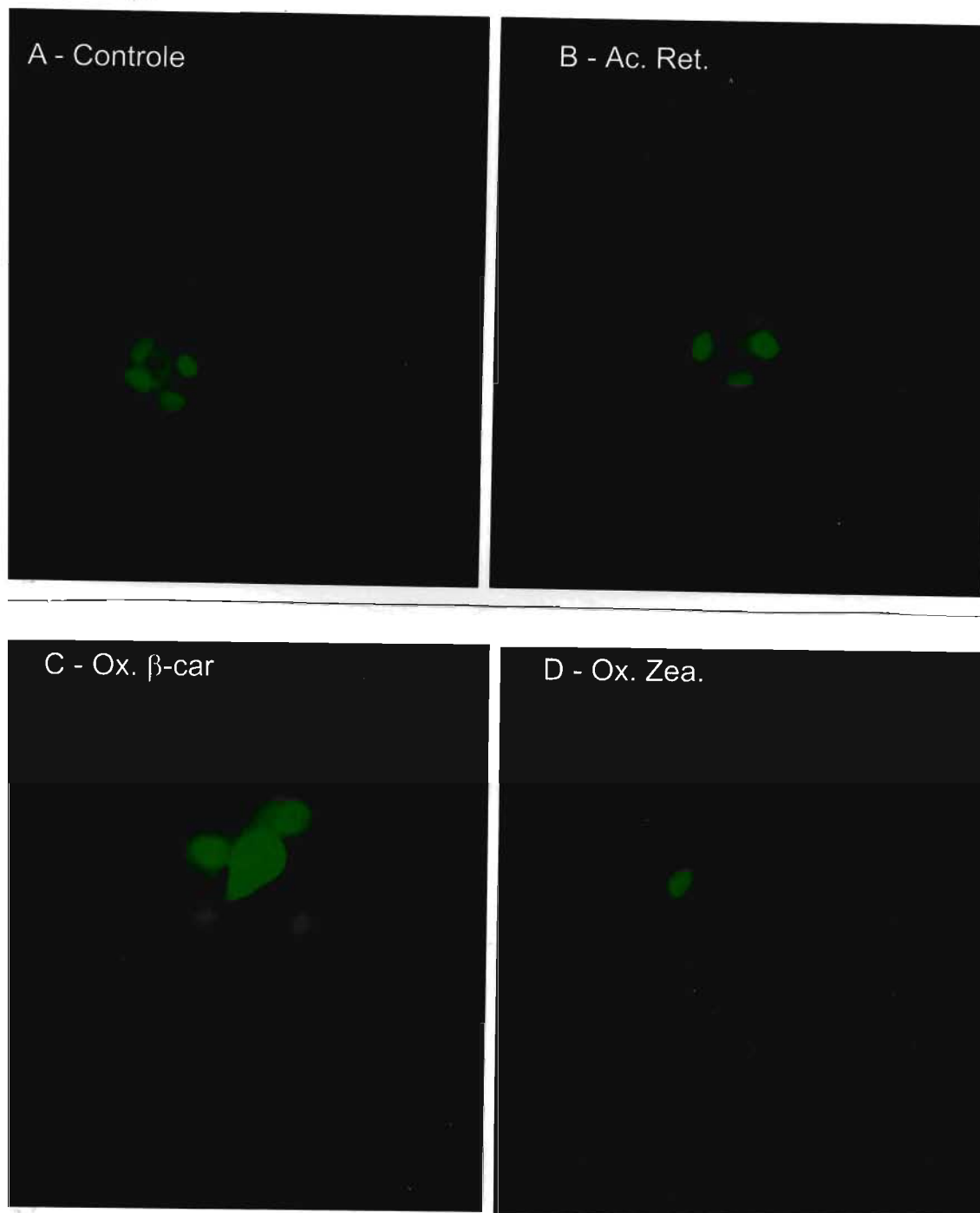


Figura 4.44: Ensaio para verificação da comunicação intercelular via junções comunicantes, utilizando o corante fluorescente (Lucifer yellow). Legenda: Ac. Ret.: ácido retinóico; Ox. Zea: zeaxantina oxidada; Ox. β-car: β-caroteno oxidado; β-apo: β-apo-8'-carotenal (vide Materiais e Métodos itens 3.13.1 e 3.13.3).

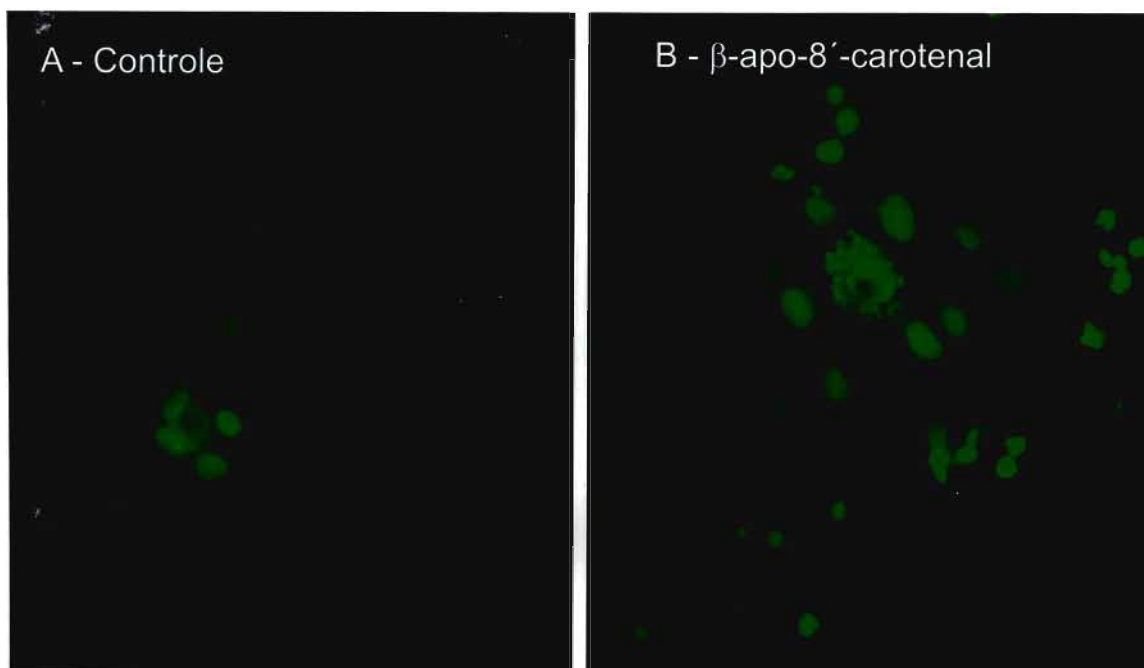


Figura 4.45: Ensaio para verificação da comunicação intercelular via junções comunicantes, utilizando o corante fluorescente (Lucifer yellow) (vide Materiais e Métodos itens 3.13.1 e 3.13.3).

Discussão

5- DISCUSSÃO

5.1 – Formação de produtos da reação entre 2'-desoxiguanosina (dGuo) e retinal

O nosso laboratório tem contribuído nas pesquisas de eteno adutos, com a caracterização da estrutura química de diversos adutos exocíclicos de DNA (Carvalho e col., 1998; Carvalho e col., 2000; Loureiro e col., 2000, Loureiro e col. 2004). Nos estudos em sistemas modelo *in vitro*, nos quais fizemos reações entre retinal e dGuo, verificamos que sem a utilização do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) não foi possível detectar novos produtos em análises de HPLC acoplado à detecção de UV. A adição do peróxido proporcionou a detecção de novos produtos desta reação. Este tipo de resultado indica que a adição de peróxido leva a epoxidação do aldeído, formando produtos mais reativos frente ao grupo amina do nucleosídeo, possibilitando assim a formação de adutos (Ehrenberg e col., 1977; Segerback, 1983; Nair & Offerman, 1985; Chen & Chung, 1996; Loureiro e col., 2000; Loureiro e col., 2002a para revisão).

A análise destes compostos formados por espectrometria de massa indicou que estes são modificações do nucleosídeo, mais precisamente alquilações no nucleosídeo, devido à adição de massa. A perda do fragmento característico de desoxirribose, confirmou a formação dos adutos.

Constatamos a formação de diversos adutos entre retinal e dGuo, entretanto, apenas um deles foi caracterizado; sendo o 1,N²-εdGuo, aduto já comprovadamente mutagênico, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

5.2 – Validação da metodologia da detecção do 1, N^2 - ϵ dGuo por LC/ESI/MS-MS

O papel dos adutos no processo de mutagenicidade e possível desenvolvimento de câncer tem sido sugerido por diversos grupos de pesquisa nesta área. Entretanto, para o estudo desses mecanismos é fundamental o desenvolvimento de técnicas sensíveis que permitam a análise desses adutos *in vivo* para que se possa considerá-los como possíveis marcadores de exposição a produtos exógenos e endógenos (Akasaka & Guengerich, 1999; Kox & Swenberg, 2002).

Muitos métodos foram desenvolvidos para a quantificação de adutos de DNA, dentre as técnicas utilizadas temos: o ^{32}P -postlabeling (PPL), a cromatografia líquida acoplada a detecção eletroquímica, a cromatografia líquida acoplada à detecção por fluorescência, a técnica de imunoafinidade que utiliza anticorpos monoclonais e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (Koc & Swenberg, 2002).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-ESI/MS-MS) vem sendo amplamente utilizada na detecção de adutos (Yen e col., 1998; Chen e col., 1999; Doerge e col., 2000; Churchwell e col., 2002; Gonzalez-Reche e col., 2002; Chen e col., 2004; Chen & Chang., 2004). Fazendo uso desta técnica, desenvolvemos um método sensível para a quantificação do 1, N^2 - ϵ dGuo em amostras de DNA. A maior vantagem do método é a separação dos nucleosídeos e a exatidão fornecida pela detecção por MS-MS. O método resolve problemas como os envolvidos em etapas de pré-purificação que podem levar a possíveis contaminações. A adição de um padrão interno isotopicamente marcado antes da hidrólise, aumenta a confiabilidade do método já que permite uma correção de possíveis perdas do analito durante a hidrólise. O padrão isotópico (marcado com ^{15}N) já havia sido sintetizado para estudos anteriores em nosso laboratório (Loureiro e col., 2000).

O método nos permitiu a determinação de níveis basais de 1, N^2 - ϵ dGuo em DNA de timo de bezerro comercial ($1,70 \pm 0,09$ adutos/ 10^7 dGuo), também em DNA de células da linhagem CV1-P ($4,5 \pm 0,4$ adutos/ 10^7 dGuo) e em DNA fígado

de ratas fêmeas ($5,22 \pm 1,37$ adutos/ 10^7 dGuo). Morinello e col. (2001), utilizando uma técnica de imunoafinidade/GC/ECNCl-HRMS, conseguiram quantificar níveis basais de N^2 - ϵ dGua em DNA de timo de bezerro (0,8 adutos / 10^7 Gua). Embora a técnica utilizada fosse sensível, a presença endógena de $1,N^2$ - ϵ dGuo em tecidos de animais não pôde ser demonstrada. Sendo assim, a detecção e quantificação do nível basal de $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de tecidos obtida por nosso grupo é inédita na literatura.

O níveis aqui obtidos (5,22 adutos / 10^7 dGuo para DNA de fígado de ratas; 1,70 adutos 10^7 dGuo para DNA de timo de bezerro) são comparáveis aos descritos na literatura para o aduto ϵ dCyd (4,4 adutos / 10^7 dCyd) em DNA de fígado de rato, valores estes encontrados utilizando-se metodologia similar (Roberts e col., 2001). Uma quantidade maior de ϵ dAdo (25 adutos / 10^7 dAdo) foi detectada em DNA de placenta humana utilizando-se as metodologias GC/MS; LC/MS e HPLC/Fluorescência (Chen e col., 1999).

O aduto aqui estudado leva ao bloqueio da replicação e a incorporação errada de dATP e dGTP (Langouët e col., 1997). Além disto, este aduto pode levar a mutações $G \rightarrow A$ e $G \rightarrow T$ (Langouët e col., 1998). Deleções, rearranjos, duplos mutantes e substituições de pares de bases também foram observadas perto do sítio de ocorrência do $1,N^2$ - ϵ dGuo (Akasaka & Guengerich, 1999). Saparbaev e col. (2002) mostraram que $1,N^2$ -eteno-guanina ($1,N^2$ - ϵ Gua) é um substrato das enzimas de reparo uracil-DNA glicosilase de *E.coli* e da alquilpurina-DNA-*N*-glicosilase humana. Estes dados reforçam o papel biológico deste aduto.

O possível uso de eteno adutos como marcadores biológicos de lesões em DNA necessita de metodologias de execução mais simples que as descritas na literatura e que forneçam confiabilidade. Neste sentido, a metodologia aqui descrita fornece uma maneira precisa e específica de detectar e quantificar $1,N^2$ - ϵ dGuo em DNA de tecidos, podendo no futuro ser empregada para estudo das conseqüências biológicas desse tipo de lesão em DNA em condições normais e patológicas.

5.3- Quantificação de lesões em dGuo/DNA induzidas por carotenóides

Estudos mostram a possibilidade dos produtos de oxidação do β -caroteno agirem como agentes pró-carcinogênicos (Paolini e col, 1999; Perocco e col, 1999; Salgo e col 1999). Salgo e colaboradores (1999) verificaram o aumento da ligação de metabólitos do benzopireno ao DNA em microssomas de fígado de rato por produtos de oxidação do β -caroteno. Neste estudo, uma mistura de β -caroteno oxidado foi incorporada a membranas de microssomas verificando-se um aumento da ligação do benzopireno tritiado ao DNA; já o β -caroteno não oxidado mostrou uma redução nesta ligação.

Apesar de diversos estudos fortalecerem a hipótese de que o β -caroteno deve agir como agente anticarcinogênico, seus produtos de oxidação podem induzir a carcinogênese via reação direta com o DNA ou ainda pelos seus metabólitos formados pela ação das enzimas do citocromo P450 (Wang & Russell, 1999).

A literatura relata o fato de que aldeídos formados na lipoperoxidação podem sofrer ativação por peróxidos levando a formação de modificações em DNA. Os produtos formados a partir de modificações do tipo alquilações são chamados de adutos de DNA (Carvalho e col., 1998; Carvalho e col., 2000; Loureiro e col., 2000). Já é conhecido que o β -caroteno se oxida e forma vários outros compostos, entre eles aldeídos α , β -insaturados (Wang e col., 1999; Arora e col., 2001), sendo assim nossos estudos se concentraram na investigação da formação do 1, N^2 - ϵ dGuo a partir do β -caroteno, β -apo-8'-carotenal e retinal em DNA, utilizando-se para sua detecção e quantificação o método baseado em LC/ESI/MS-MS.

Inicialmente, em nossos estudos com retinal e dGuo, não verificamos a formação do produto em questão na ausência de peróxido; entretanto, isto deve-se ao fato da detecção por ultravioleta do HPLC não ser sensível o suficiente para detectar as quantidades do produto, que é formado sem a adição do peróxido. Com o desenvolvimento da técnica por LC/ESI/MS-MS, verificamos que a formação do 1, N^2 - ϵ dGuo ocorre tanto na presença quanto na ausência de H_2O_2 e

também que este tipo de reação além de ocorrer com o nucleosídeo isolado (dGuo), também é capaz de ocorrer com DNA de timo de bezerro.

Para efeitos comparativos, também verificamos a formação da lesão 8-oxodGuo, uma oxidação freqüente que ocorre na 2'-desoxiguanosina (Cooke e col., 2003; Cadet e col., 2003). Esta lesão é medida por HPLC acoplado à detecção eletroquímica.

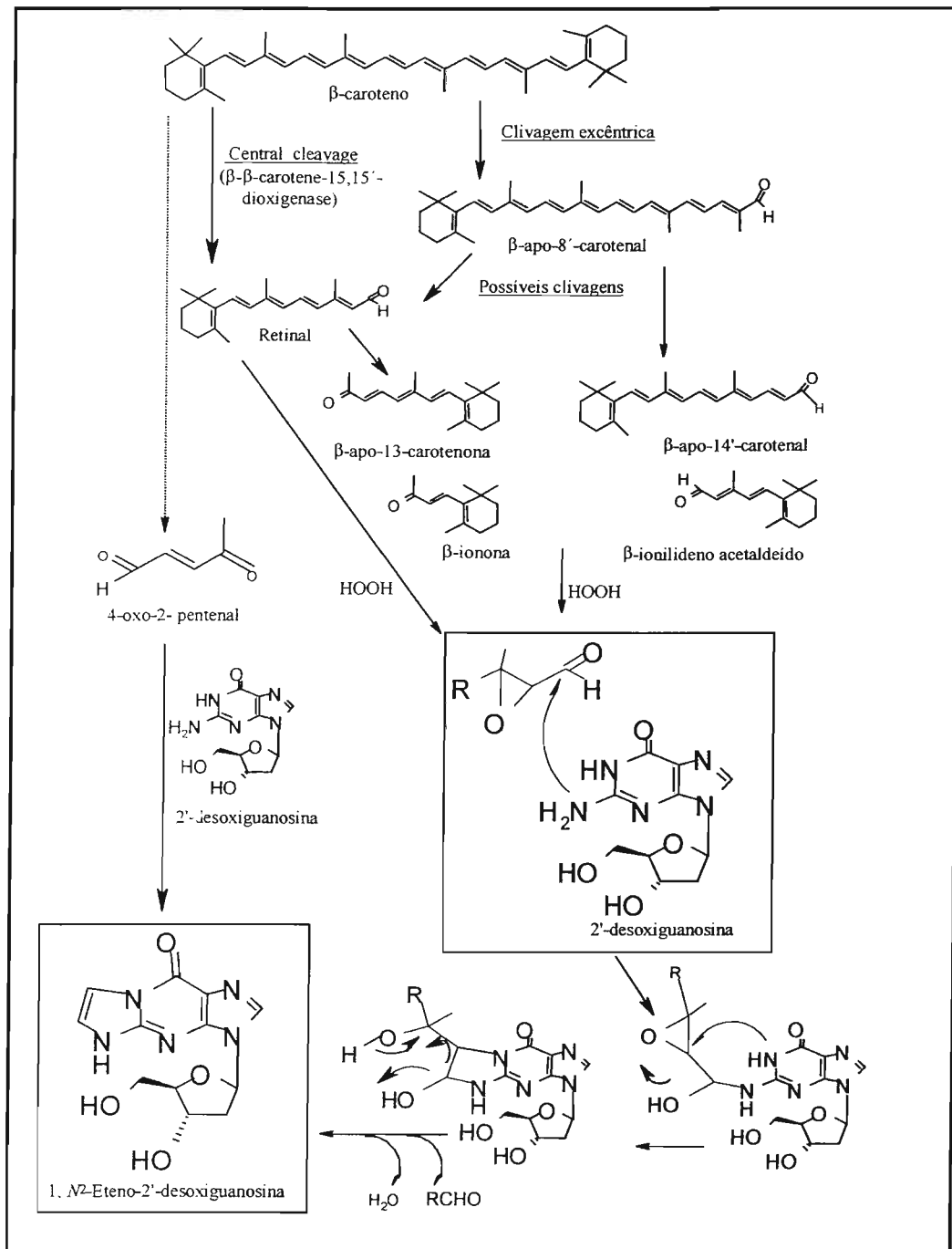
Nossos estudos mostraram que os carotenóides como β -caroteno, β -apo-8'-carotenal e retinal são capazes de lesar tanto a dGuo quanto o DNA de timo de bezerro, levando ao aumento da formação do $1,N^2$ - ϵ dGuo e da 8-oxodGuo tanto na presença quanto na ausência de peróxido. Logicamente, ocorre um aumento bem expressivo no nível de 8-oxodGuo em incubações com peróxido já que este na presença de metais contaminantes irá levar à formação da lesão. A literatura relata a formação desta lesão em DNA de timo de bezerro exposto ao β -caroteno auto-oxidado (Yeh e col., 2003).

Detectamos a formação da lesão $1,N^2$ - ϵ dGuo em dGuo, tanto nas incubações realizadas na presença ou ausência de peróxidos, confirmando o fato de que o método por espectrometria de massa foi sensível o suficiente para detectar a formação desta lesão, o que apenas com a detecção de ultravioleta não foi possível.

Observamos que os valores encontrados nas incubações de dGuo em presença de peróxido para os níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo são maiores que os encontrados nas incubações com DNA de timo de bezerro. Estes dados são esperados uma vez que a reação com o DNA é mais dificultada por fatores estruturais. O nível do aduto formado nas incubações utilizando-se o peróxido de hidrogênio também é superior ao nível obtido na ausência de peróxido, tanto para reações com dGuo quanto com DNA de timo de bezerro, o que confirma o mecanismo de epoxidação dos aldeídos (Loureiro e col., 2000).

Além disso, o nível de $1,N^2$ - ϵ dGuo é maior nas incubações realizadas em pH 9,4, do que as realizadas em pH 7,4 devido ao favorecimento de formação do aduto em pH básico (Morinello e col., 2001). Em conclusão, os dados mostram que tanto o DNA como o nucleosídeo (dGuo) isolados levam ao aumento na formação de eteno aduto quando incubados na presença de produtos de oxidação do β -caroteno. A degradação de carotenóides em sistemas modelo foi

extensivamente estudada (Salgo e col., 1999, Mordi e col., 1993; Padula e col., 1999, Handelman e col., 1991). Num estudo a 30°C, apo-carotenóides, epóxi-carotenóides e hidróxicarotenóides foram identificados confirmando que os primeiros passos da degradação de carotenóides são a epoxidação. Ressaltamos que o composto 4-oxo-2-pentenal foi detectado como produto da degradação do β -caroteno (Padula e col., 1999). A reatividade química deste composto é similar a do 4-oxo-2-nonenal, um eletrófilo bifuncional descrito por Rindgen e col. (1999). Este aldeído é o produto principal de degradação do hidroperóxido do ácido linoléico e é conhecido por reagir com dAdo, dGuo, e dCyd, levando a formação de eteno adutos (Pollack e col., 2003; Lee e col., 2000). Portanto, o 4-oxo-2-pentenal pode contribuir com a formação do aduto em reações realizadas na presença ou ausência de peróxido de hidrogênio. É interessante notar que estudos anteriores mostram que o 4-oxo-2-pentenal é formado também por ativação metabólica da *N*-nitrosopiperidina uma nitrosamina cíclica carcinogênica, levando a formação de eteno adutos com substituições em suas cadeias (Liu e col., 1996; Wong e col., 2003). O mecanismo para a formação do 1,*N*²- ϵ dGuo a partir do tratamento do DNA ou dGuo com os carotenóides aqui estudados está ilustrado no esquema 5.1. Este mecanismo tem como base os mecanismos de formação deste mesmo aduto a partir de aldeídos α,β -insaturados como o DDE (Carvalho e col, 1998; Carvalho e col., 2000; Loureiro e col., 2000).



Esquema 5.1: Mecanismo proposto para a formação do 1,N²-εdGuo a partir do β-caroteno.

Nas incubações com o quelante de metal, solução de desferroxamina (0,1 mM) realizadas em pH 7,4, verificamos que houve um efeito inibitório na formação deste aduto (20-30%) com a adição do quelante. O mecanismo iniciador da auto-oxidação do β -caroteno ainda não foi totalmente desvendado, podendo ser devido à presença de peróxidos e metais contaminantes. Muitos estudos mostram que mesmo sem a adição de iniciadores radiculares, o β -caroteno puro se oxida muito rapidamente em solução, mesmo na ausência de luz. A velocidade do consumo do β -caroteno é dependente da pressão de oxigênio e a curva de consumo de oxigênio é consistente com uma reação autocatalítica. Handelman e col. (1991) sugeriram que amostras de β -caroteno devem conter um iniciador que resulta na auto-oxidação espontânea que foi verificada. Assim, nossos resultados mostram que existe um mecanismo radicalar ocorrendo pela presença de metais ou peróxidos contaminantes que favorece uma possível formação de produtos oxidativos dos carotenóides que facilitam a formação do aduto em questão.

Os níveis de 1, N^2 - ϵ dGuo encontrados nas incubações controle podem ser explicados pela formação do fosfoglicolaldeído, um produto da oxidação da 3'-desoxiribose no DNA (Angeloff e col., 2001, Awada & Dedon 2001). O fosfoglicolaldeído possui estrutura análoga ao cloroacetaldéido, um metabólito do cloreto de vinila que leva a formação do eteno aduto (Sattangi e col., 1977; Kusmierek e col., 1989; Folkman e col., 1990; Kusmierek & Singer, 1992; Guengerich, 1992). O efeito da incubação de DNA já foi demonstrado em experimentos que realizamos anteriormente (Loureiro e col., 2002b) e também por Morinello e col. (2001).

A medida de mais de um biomarcador de lesões oxidativas é interessante pois caso um deles não seja um bom marcador para o tipo de exposição exógena estudada, teremos resultados que não refletem a real influência do composto ao qual o organismo está sendo exposto. Com o intuito de compararmos o efeito do β -caroteno e de seus produtos de oxidação em diferentes tipos de lesões em DNA, analisamos a formação da 8-oxodGuo. Esta é uma das lesões oxidativas mais estudadas em DNA. Estudos sugerem que uma a cada 40000 guaninas no genoma se apresenta como 8-oxodGuo sob condições normais (Burrows & Muller, 1998).

É interessante observar que essa lesão pode ser produzida por processos oxidativos e espécies reativas, como o radical hidroxila e peroxinitrito (Floyd e col., 1988; Burrows & Muller, 1998; Cadet e col., 1997), sendo considerada um biomarcador de estresse oxidativo (Kasai e col., 1992; Breen & Murphy, 1995; Spassky & Angelov, 1997; Helbock e col., 1999). Vale ressaltar que a 8-oxodGuo é facilmente oxidável, portanto não é um biomarcador confiável.

Os resultados mostram um aumento no nível de 8-oxodGuo em dGuo e DNA de timo de bezerro tratado com os carotenóides em ambos os pHs. Como já mencionado, devido à formação de espécies radicalares, as incubações realizadas na presença de peróxido de hidrogênio, apresentam um aumento maior de 8-oxodGuo. Nos casos em que não foi possível observar um aumento maior nos níveis de 8-oxodGuo, nas incubações entre carotenóides e dGuo realizadas na presença do peróxido de hidrogênio (vide Resultados; item 4.3.1.2: *tabela 4.5*: os valores de 8-oxodGuo obtidos para o retinal e o β -caroteno em pH 9,4 na ausência de peróxido foram superiores aos obtidos com adição de peróxido; *tabela 4.6*: o mesmo foi verificado para o controle em pH 7,4), pode ter ocorrido a oxidação da 8-oxodGuo, uma vez que ela apresenta uma potencial de oxidação menor do que qualquer nucleosídeo natural (Ravanat e col., 2003). Sendo assim, a 8-oxodGuo torna-se um alvo preferencial de outros oxidantes (Burrows & Muller, 1998; Cadet e col., 2003; Misiaszek e col., 2004). Esta oxidação pode ser dificultada quando temos a cadeia de DNA. Assim, nas incubações com DNA de timo de bezerro, foi possível verificar a influência do peróxido na formação de 8-oxodGuo pelo mecanismo radicalar. Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de compreender os mecanismos de oxidação secundários da 8-oxodGuo tanto como nucleosídeo livre como quando inserida em fragmentos de DNA (Cadet e col., 2003).

Anteriormente, já havia sido verificado o aumento no nível de 8-oxodGuo em DNA de timo de bezerro incubado com retinal e CuCl_2 (Murata & Kawanishi, 2000). A literatura relata que em concentrações excessivas, retinol e retinal podem sofrer auto-oxidação gerando o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) que é dismutado à H_2O_2 ; esta espécie por sua vez forma o complexo DNA-Cu(I)- H_2O_2 , lesando o DNA (Murata & Kawanishi, 2000). Este trabalho menciona também que derivados da vitamina A como β -ionona e mesmo o β -caroteno induzem danos em DNA,

incluindo 8-oxodGuo na presença de cobre (II); entretanto, os danos são bem menores que aqueles verificados pela ação do retinol e do retinal (Murata & Kawanishi, 2000). Recentemente foi verificado que DNA de timo de bezerro exposto ao β -caroteno auto-oxidado leva à formação da 8-oxodGuo (Yeh e col., 2003).

Portanto, tanto em DNA de timo de bezerro quanto em dGuo, os produtos de oxidação do β -caroteno levam ao aumento na formação das duas lesões estudadas, 1,N²- ϵ dGuo e a 8-oxodGuo.

5.4 – Lesões em DNA de células pulmonares em cultura induzidas por carotenóides

Nossos resultados com o β -caroteno e seus produtos de oxidação mostraram um aumento na formação das lesões 8-oxodGuo e 1,N²- ϵ dGuo em DNA de timo de bezerro e dGuo. Sendo assim, investigamos também a formação destas lesões em DNA de células de pulmão humano, linhagem IMR 90. Após testes de viabilidade celular com β -caroteno, β -apo-8'-carotenal e retinal (vide item 4.3.3.1), a concentração de 20 μ M foi selecionada, uma vez que nessa concentração, observamos pelo menos 70% de viabilidade celular para os três carotenóides testados após 17 h de incubação. Kaneko e col. (1988) relatam que aldeídos administrados às células em meio de cultura complexo, podem ter sua citotoxicidade subestimadas, devido a possíveis reações com grupos tióis e aminas presentes nos componentes do meio; mesmo assim, o experimento teve de ser realizado na presença de soro fetal bovino (SFB), pois em testes preliminares na ausência do soro, estas perdiam sua viabilidade mesmo sem tratamento algum.

O tratamento das células de pulmão humano (IMR 90) com os carotenóides nos forneceu resultados importantes. Este sistema foi utilizado para auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos no aumento dos níveis de câncer pulmonar em fumantes suplementados com β -caroteno. Após o período de incubação, verificamos um aumento no nível de 1,N²- ϵ dGuo nas células tratadas com os carotenóides comparadas ao controle com THF. Para o retinal foi verificado um aumento de 2,5 vezes o valor obtido para o controle; para o β -apo-8'-carotenal e para o β -caroteno o aumento foi cerca de 2 vezes.

Tanto mecanismos de ação fisiológica antioxidante como pró-oxidante foram sugeridos para o β -caroteno. Sua estrutura química de ligações duplas conjugadas é associada à sua capacidade de ação antioxidante. Entretanto, estas duplas conjugadas conferem um caráter pró-oxidante já que são suscetíveis a ataques de espécies radicalares, principalmente a altas tensões de oxigênio (Palozza e col., 1995 e Palozza e col., 1997; Zhang & Omaye, 2001).

Os carotenóides aqui estudados também levaram a um aumento na formação da 8-oxodGuo; comparado aos controles, o aumento para o retinal foi de 3,7 vezes, o do β -apo-8'-carotenal de 1,5 vezes e do β -caroteno de 1,7 vezes. O aumento mais elevado tanto no nível de 1,N²- ϵ dGuo quanto de 8-oxodGuo verificado no tratamento das células com retinal pode também ser devido a sua maior citotoxicidade quando comparado aos demais carotenóides estudados.

A literatura já havia relatado o aumento na oxidação de DNA verificada pelo β -caroteno e o licopeno oxidados pela análise de 8-oxodGuo em fibroblastos humanos de prepúcio e em DNA de timo de bezerro (Yeh & Hu, 2001). Foi verificada também a interação do β -caroteno com fumaça de cigarro em células epiteliais de brônquios humanos. Neste estudo, constatou-se também a diminuição do carotenóide e o aumento de seus produtos oxidados, como 4-nitro- β -caroteno, β -apo-carotenais e epóxidos do β -caroteno (Arora e col., 2001).

Em DNA de células HL-60, foi verificado o aumento de 8-oxodGuo no tratamento com retinal mas não na linhagem celular resistente à H₂O₂. Os autores Murata & Kawanishi (2000) atribuem este fato à geração do ânion superóxido na auto-oxidação de retinóides que é dismutado à H₂O₂, espécie responsável por lesões em DNA na presença de metais endógenos (Murata & Kawanishi, 2000). O β -caroteno também aumentou a susceptibilidade de células HepG2 a danos em DNA provocados por H₂O₂; além disso, neste estudo foi verificado que um pré-tratamento das células com este carotenóide aumenta a citotoxicidade induzida por H₂O₂ (Woods e col., 1999). Tanto o β -caroteno quanto o licopeno também não protegeram células humanas de carcinoma de cólon (HT29) contra efeitos do H₂O₂ (Lowe e col., 1999). Além disso, β -caroteno e o licopeno levaram a um aumento na peroxidação lipídica em células Hs68 (Yeh & Hu, 2000). Recentemente, Palozza e col., 2004, verificaram que em diferentes linhagens celulares ocorre um aumento no nível de 8-oxodGuo em células tratadas com alcatrão. Na presença de β -caroteno (1 μ M); este efeito foi significativamente mais acentuado. A adição do carotenóide também aumentou a expressão de ciclooxigenase-2 induzida por alcatrão. Em contrapartida, foi verificado que o β -caroteno protege contra o envelhecimento (radiação UV) associado à mutações no DNA mitocondrial (Eicker e col., 2003). Uma mistura entre β -caroteno, α -

tocoferol e ácido ascórbico apresentou sinergismo e levou a efeitos protetores contra a oxidação de proteínas comparados à sua administração individual (Zhang & Omaye, 2001).

O aumento na formação de duas lesões aqui estudadas está em concordância com os resultados obtidos nos estudos mencionados. Ressaltamos que neste tipo de células (IMR 90) detectamos níveis basais do aduto ($1,9 \pm 0,3$ adutos / 10^7 dGuo) , o que confirma a hipótese de geração desses adutos por produtos gerados endogenamente.

É importante ressaltar que a conjugação de glutathiona (GSH), catalisada por glutathiona-S-transferase, com aldeídos formados durante a lipoperoxidação é uma importante via de detoxificação destes compostos (Niknahad e col., 2003). Reações de conjugação com glutathiona foram sugeridas como uma das principais vias de detoxificação de (*trans*-4-hidroxi-2-nonenal) HNE e outros aldeídos α,β -insaturados como *trans*-2-alcenais e *trans,trans*-2,4-alcadienais. Estes compostos seriam metabolizados para os correspondentes ácidos mercaptúricos e excretados. Estas reações de conjugação seriam via adição de Michael ou catalisadas por glutathiona-S-transferases (Fujita e col., 1994; Eisenbrand e col., 1995; Spitz e col., 1991).

A capacidade das células na manutenção do nível de GSH em resposta a um estímulo tóxico é importante para evitar a perda de função e integridade celular. Este nível é mantido pela redução de GSSG a GSH promovida por NADPH, numa reação catalisada por glutathiona redutase. Pode-se elevar o nível de GSH pela GSH sintetase e γ -glutamilcisteína sintetase (Richman & Meister, 1975). Estudos mostram que substâncias eletrofilicas e/ou indutoras de estresse oxidativo levam a um aumento da expressão do gene da γ -glutamilcisteína sintetase, a enzima que determina a velocidade de síntese de GSH, com subsequente elevação do seu nível intracelular (Uchida e col., 1999). A investigação do efeito dos produtos de oxidação dos carotenóides em células depletadas em glutathiona (adição de 1-bromoheptano) também seria um experimento interessante na investigação dos danos causados por estes produtos e conseqüentemente deste mecanismo de detoxificação.

5.5 – Biodisponibilidade do β -caroteno e do licopeno

Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de frutas e vegetais auxilia na prevenção do câncer. Este efeito tem sido atribuído a diversos compostos como as fibras, ácido fólico, vitamina A entre outros antioxidantes (vitamina C, vitamina E, carotenóides e selênio) presentes na dieta (Ames e col., 1995; Giovannucci, 1999; Treber, 2004; Riso e col., 2004; Molldrem e col., 2004). Como os carotenóides são amplamente distribuídos em alimentos e devido ao seu possível envolvimento na prevenção contra danos em biomoléculas (atividade antioxidante), que podem resultar em um aumento no nível de estresse oxidativo, elevou-se o interesse em elucidar os mecanismos moleculares responsáveis por seu efeito biológico (Sharoni e col., 2004). Além da conhecida atividade pró-vitamina A de alguns dos carotenóides, parte de seu efeito benéfico é atribuída à sua atividade antioxidante (Stahl & Sies, 1996). Sua habilidade em sequestrar radicais livres e de suprimir o oxigênio singlete já foi descrita na literatura (Kennedy & Liebler, 1992; Palozza & Krinsky, 1992; Terao, 1989; Di Mascio e col., 1989). Os carotenóides também têm participação importante em outros mecanismos biológicos como na comunicação intercelular via junções comunicantes, no sistema imunológico e em reações metabólicas (Rao & Agarwal, 2000; Stahl e col., 2000; Ale-Agha e col., 2002). Recentemente, a bioquímica dos carotenóides ampliou as pesquisas sobre seu mecanismo de ação uma vez que, possivelmente, eles estão envolvidos em mecanismos como proliferação, fator de crescimento e diferenciação celular. Podem ainda produzir alterações na expressão de muitas proteínas que participam destes processos (Sharoni e col., 2004).

Como os carotenóides possuem propriedades físicas e estruturais distintas, devem apresentar diferenças em sua dinâmica de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (Parker, 1996; Bierer e col., 1995; Erdman e col., 1993; Clinton, 1998). Assim, é importante estudar a biodisponibilidade destes carotenóides para entendermos melhor como será sua cinética de distribuição aos tecidos, e consequente passagem pela corrente sanguínea. Sendo assim,

iniciamos nossos estudos *in vivo* verificando a biodisponibilidade de dois importantes carotenóides, o β -caroteno e o licopeno, após sua administração *i.p.*

Os dados obtidos para a biodisponibilidade do β -caroteno (Fig. 4.33) mostram um aumento na concentração deste carotenóide após 3 horas da injeção *i.p.* em ratos. A máxima concentração plasmática se deu após 6 e 9 horas da administração. Após 24 horas, a concentração plasmática do β -caroteno teve uma grande diminuição, provavelmente devido à sua distribuição aos órgãos do animal (Glise e col., 1998).

É interessante notar que, mesmo com os animais suplementados apenas com o β -caroteno, foi possível se detectar a presença do licopeno no sangue. Este fato pode ser devido à concentração deste antioxidante e sua presença nos farelos constituintes da dieta dos animais.

A análise da biodisponibilidade obtida para o licopeno (Figura: 4.33) apresenta um perfil diferente da obtida para o β -caroteno. Sua concentração plasmática máxima é após 3 horas da injeção *i.p.*, tendo sua concentração diminuída durante o resto do período de análise. Sendo assim, o licopeno parece ser mais rapidamente absorvido pelos tecidos.

Como já mencionado, os carotenóides devem apresentar perfis distintos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. As propriedades físicas definidas pela estrutura parecem contribuir para a variação de sua distribuição específica nas diversas classes de lipoproteínas já que, no plasma, os carotenóides são transportados exclusivamente por elas (Krinsky e col., 1958, Parker, 1996; Clinton, 1998). Especula-se que carotenóides muito lipofílicos como o licopeno são encontrados dentro da região hidrofóbica da lipoproteína, ao passo que carotenóides que possuem grupos polares se estendem parcialmente sobre a interface aquosa da superfície das lipoproteínas (Clinton, 1998).

Experimentos de biodisponibilidade, embora apresentem resultados simples, são muito importantes para estudos em que se procuram verificar o efeito antioxidante dos carotenóides. Glise e col. (1998) já haviam feito estudos semelhantes com o β -caroteno em camundongos, verificando seu máximo de absorção após 2 h. Vale ressaltar que ratos não são modelos exemplares de estudos para carotenóides já que, a absorção destes compostos em ratos é diferente da absorção em humanos (Lee e col., 1999). Um dos melhores modelos

para estudos com o β -caroteno são os furões, pois estes apresentam um aumento na concentração de β -caroteno de 17-22 vezes, após a suplementação com este carotenóide. Este aumento é semelhante aos observados nos indivíduos participantes das triagens humanas. Além disso, a arquitetura do pulmão, a formação dos produtos de oxidação do β -caroteno e os níveis de retinal, ácido retinóico e do próprio β -caroteno são semelhantes aos dos humanos (Wang e col., 1991; Wang e col., 1999).

O estudo da biodisponibilidade de carotenóides em diferentes tipos de alimentos, é certamente interessante. Gärtner e col. (1997) verificaram que o licopeno é mais biodisponível em pasta de tomate que em tomates frescos. Os níveis do licopeno obtidos a partir de tomates frescos e pasta de tomates foram 0,282 e 0,360 nmol/ mL de plasma, respectivamente. Já, para o β -caroteno os níveis ficaram praticamente iguais, sendo 0,220 nmol/ mL de plasma.

Numa comparação entre o nível plasmático de carotenóides como o β -caroteno e licopeno em indivíduos adultos, observou-se que em países como os Estados Unidos o nível plasmático de β -caroteno foi de 0,336 nmol/ mL de plasma e do licopeno de 0,842 nmol/ mL de plasma. O nível de licopeno é extremamente alto comparado aos nível de países como Japão (0,465 nmol/mL) e Holanda (0,220 nmol/mL) (Apgar e col., 1996).

5.6 – Lesões em DNA de pulmões de ratos suplementados com β -caroteno e expostos à fumaça de cigarro

Os estudos epidemiológicos ATBC e CARET (Heinonem & Albanes, 1994; Omenn e col., 1996) mostraram uma tendência de aumento no nível de câncer em pulmão de fumantes suplementados com β -caroteno, após o acompanhamento destes indivíduos por aproximadamente 6,5 e 5 anos, respectivamente. Assim, na tentativa de investigar este mecanismo e após os resultados indicativos de um efeito pró-oxidante do β -caroteno que obtivemos em nossos sistemas *in vitro*, realizamos experimentos *in vivo*, utilizando animais,

suplementados com β -caroteno e expostos à fumaça de cigarro por 7, 30 e 180 dias.

Os resultados obtidos nos estudos com ratos indicaram aumento nos níveis do $1,N^2$ - ϵ dGuo nos animais suplementados por 7, 30 e 180 dias com β -caroteno quando comparados aos animais tratados apenas com veículo. Este resultado foi surpreendente, uma vez que, apesar das diversas evidências mostrando outras funções fisiológicas dos carotenóides além da atividade pró-vitamina A e de estudos indicando redução de risco de doenças, não existe até o momento provas decisivas que indiquem recomendações dietárias ótimas ou toxicidade do β -caroteno. Apesar disso, nem nos tratamentos de longa-duração de pacientes com protoporfíria eritrocítica que receberam altas doses de β -caroteno (20-180 mg/dia) (Mathews-Roth, 1993), nem no estudo com profissionais da saúde "Physician Health Study" (25 mg/dia) (Hennekens e col., 1996), nenhuma toxicidade foi observada. Não existe até o momento nenhuma evidência que altas doses de carotenóides de fontes naturais sejam perigosas; ao contrário, dietas ricas em alimentos contendo carotenóides têm sido associadas com efeitos benéficos para a saúde (van den Berg e col., 2000). Portanto, os dados obtidos com esse grupo de estudo estão apontando uma lesão em DNA que, se não reparada, pode levar a efeitos deletérios. Os dados aqui apresentados indicam que mais estudos são necessários para a compreensão dos efeitos fisiológicos do β -caroteno e das doses de ingestão segura deste carotenóide.

Com relação à exposição à fumaça de cigarro, os níveis do $1,N^2$ - ϵ dGuo mostraram uma tendência de aumento aos 7 dias que foi revertida com 30 dias de exposição, havendo novamente um aumento, agora significativo, após 180 dias. Estes dados podem estar indicando uma resposta adaptativa do organismo frente ao agente agressor, induzindo enzimas antioxidantes e de reparo. Esta adaptação já foi relatada por Lykkesfeldt e col. (2003), que observaram indução na atividade da dehidroascorbato redutase, responsável pela reciclagem de ascorbato em eritrócitos de fumantes *in vivo*. Estudos complementares, aumentando o tempo de exposição e o número de animais, são necessários para melhor avaliação desta resposta. Vale ressaltar que Chen e col. (2003) mostraram a excreção urinária de $3,N^4$ -eteno-citosina em amostras de urina de fumantes. Neste caso, os níveis deste eteno aduto estavam significativamente aumentados ($2,65 \pm 4,0$

ng/kg/g de creatinina) quando comparados aos controles ($0,61 \pm 0,90$ ng/kg/g de creatinina). Os autores sugerem que a medida deste eteno aduto na urina pode ser um biomarcador não invasivo para danos em DNA e estudos de prevenção de câncer em fumantes (Chen e col., 2003).

Novamente, observamos um aumento nos níveis do eteno aduto no grupo suplementado com β -caroteno e exposto à fumaça de cigarro quando comparado ao grupo exposto apenas à fumaça de cigarro nos tratamentos de 7 e 180 dias. Entretanto, não observamos o efeito sinérgico da fumaça com o carotenóide, uma vez que o grupo suplementado com β -caroteno não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo suplementado com β -caroteno e exposto à fumaça de cigarro, indicando que o aumento no nível do $1,N^2$ - ϵ dGuo é devido apenas à suplementação com o carotenóide. Não podemos, entretanto, descartar a possibilidade deste aduto ($1,N^2$ - ϵ dGuo) ser instável frente às situações altamente pró-oxidantes. De fato, dados obtidos por Martinez e col. (SBBq – 2002) indicam que esta lesão é susceptível ao ataque do 1O_2 , levando à recuperação da base original.

Para efeitos comparativos, avaliamos também os níveis de outra lesão, a 8-oxodGuo que vem sendo apontada como marcadora de estresse oxidativo (Kasai e col., 1992; Breen & Murphy, 1995; Spassky & Angelov, 1997; Helbock e col., 1999). Neste caso, os níveis de 8-oxodGuo estavam aumentados nos animais suplementados com β -caroteno por 7 dias, voltaram para níveis normais após 30 dias e aumentaram significativamente após 180 dias de suplementação. Ressaltamos que esses dados são similares aos obtidos para o eteno aduto, com exceção da reversão no grupo tratado por 30 dias. Novamente, esses dados podem estar indicando um efeito adaptativo com indução de enzimas de reparo.

Os grupos expostos a fumaça de cigarro apresentaram níveis menores desta lesão após 7 dias (não significativo) e após 30 dias (significativo), mas não foram observadas alterações após 180 dias. Novamente os dados podem estar refletindo reparo, oxidação da 8-oxodGuo ou um efeito adaptativo (Wurzel e col., 1995). Neste último caso, os produtos de oxidação da 8-oxodGuo devem ser monitorados para melhor compreensão dos mecanismos responsáveis por esta diminuição (Burrows & Muller, 1998). Vale ressaltar que Arif e col. (2001) também não verificaram aumento no nível de 8-oxodGuo em pulmão de animais expostos

à fumaça de cigarro por 6 h por dia, em estudo realizado durante 1, 2, 4 e 12 semanas.

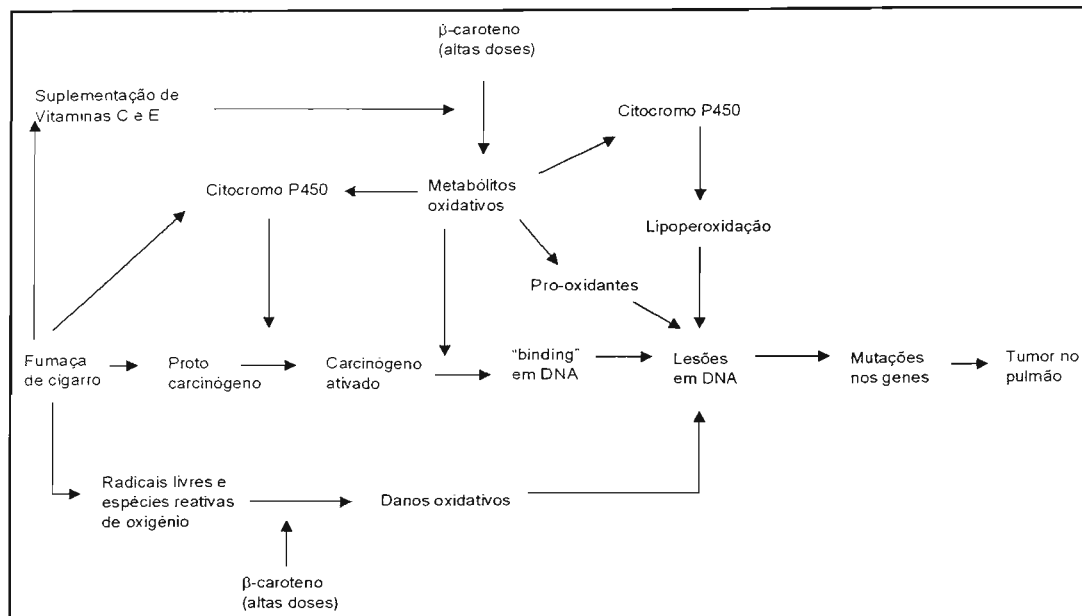
O grupo exposto à fumaça de cigarro e suplementado com β -caroteno quando comparado ao grupo apenas exposto à fumaça novamente apresentou diminuição nos níveis de 8-oxodGuo, o que poderia, à primeira vista, estar indicando um efeito protetor do carotenóide, como o descrito por Lee e col., (1998) que observaram uma diminuição do nível de 8-oxodGuo em fumantes suplementados com antioxidantes (β -caroteno e vitaminas C e E) por 4 semanas; entretanto, considerando os resultados acima, a oxidação da 8-oxodGuo não pode ser descartada. Após 180 dias, observamos aumento significativo da lesão. Surpreendentemente, quando comparamos os grupos suplementado com β -caroteno com os grupos que foram exposto à fumaça de cigarro e suplementados com o carotenóide, observamos nos 3 tratamentos uma diminuição significativa nos níveis de 8-oxodGuo. Esses dados sugerem que a utilização de lesões oxidativas como a 8-oxodGuo como marcadores de estresse oxidativo *in vivo* deve ser criticamente observada, uma vez que mecanismos de reparo podem estar constantemente atuando e a facilidade de oxidação desta lesão pode levar a níveis menores que não estão refletindo mecanismos de proteção, mas sim excesso de agentes oxidantes.

Por outro lado, a literatura relata que a glutathiona participa efetivamente na proteção dos danos causados pela fumaça ao DNA e a proteínas (Park e col., 1998; Muscat e col., 2004), sendo já verificada a formação de modificações em glutathiona por fumaça de cigarro (Reddy e col., 2002). Recentemente foi verificada que a fase particulada da fumaça de cigarro aumenta o nível de enzimas como MnSOD (superóxido dismutase) (Stringer e col, 2004).

Diversos estudos *in vivo* fortalecem a hipótese de que o β -caroteno em algumas situações deve agir como agente pró-oxidante. Wang e col. (1999) mostraram um aumento do nível pulmonar de β -caroteno nos animais suplementados e sua drástica redução naqueles expostos à fumaça de cigarro. Este estudo também indica um aumento significativo de apo-carotenais no pulmão dos animais expostos à fumaça, provavelmente devido a clivagem excêntrica do β -caroteno (Wang e col., 1999). Em estudo mais recente, Liu e col., (2003) verificaram que a exposição à fumaça de cigarro e/ou a suplementação com

doses farmacológicas de β -caroteno (2,4 mg/kg.dia, equivalente a 30 mg/dia em adultos de 60-70 Kg) levaram a indução do nível de enzimas do citocromo P450 CYP1A1 e CYP1A2 em tecidos pulmonares de furões. Esses dados sugerem que baixos níveis de ácido retinóico no pulmão de animais expostos à fumaça de cigarro e/ou β -caroteno pode ter causado um aumento no catabolismo do ácido retinóico, que é um modulador da proliferação celular e diferenciação em células epiteliais de pulmão, pela indução de enzimas do citocromo P450. Os dados sugerem um dos possíveis mecanismos de aumento da carcinogênese pulmonar observado em fumantes suplementados com β -caroteno (Liu e col., 2003). Em estudos anteriores, este grupo já havia verificado que a exposição à fumaça de cigarro, doses farmacológicas de β -caroteno e a combinação de ambos diminuíram a concentração de ácido retinóico em pulmão de furões e também levaram a uma diminuição da sinalização por retinóides, aumentando assim, a proliferação celular (Wang e col., 1999; Liu e col., 2000), em doses maiores, o β -caroteno combinado à exposição à fumaça diminuiu ainda mais o nível de ácido retinóico (Wolf, 2002).

Baker e col. (1999) verificaram que o β -caroteno pode reagir com oxidantes da fumaça de cigarro e que, na presença deste carotenóide, o condensado da fumaça pode agir significativamente como um agente de transformação celular em tratamentos agudos e crônicos (Perocco e col, 1999). O aumento da atividade de transformação celular pode ser devido a ativação do β -caroteno pelo aparato do citocromo P450 (Perocco e col., 1999; Paolini e col., 2001). O esquema 5.2 (Palozza, 1998) ilustra uma possível rota de ação do β -caroteno como agente pró-carcinogênico quando em altas doses, o que explicaria a maior incidência de câncer pulmonar em indivíduos fumantes.



Esquema. 5.2: Possível mecanismo pelo qual a alta concentração do β -caroteno pode levar ao risco de câncer de pulmão em fumantes (Palozza, 1998).

A literatura relata ainda que o DNA de tecidos de fumantes apresenta um aumento das lesões em DNA, medidas também pela excreção urinária da 8-hidroxi-desoxiguanosina (8-OHdGuo). A medida de 8-OHdGuo urinária tem sido apontada como um biomarcador sensível, no caso de fumantes e motoristas de táxi (Chuang e col., 2003).

Foi verificado também que em esperma de fumantes há elevada frequência de quebras em DNA, adutos, danos oxidativos, assim como em recém nascidos, filhos de mães fumantes (Demarini, 2004).

Nossos dados tanto do nível de 8-oxodGuo quanto do nível de 1, N^2 - ϵ dGuo indicaram que o β -caroteno *in vivo* induz o aumento de duas lesões comprovadamente mutagênicas nos animais suplementados com este carotenóide. Novamente, ressaltamos que o 4-oxo-2-pentalal foi detectado como um dos produtos de degradação do β -caroteno (Padula e col., 1999). Este composto tem reatividade similar à do 4-oxo-2-nonenal, reconhecido como capaz de levar à produção de eteno adutos com dAdo, dGuo e dCyd (Lee e col., 2000).

Hurst e col. (2004) demonstraram que o β -caroteno e o licopeno são altamente oxidados na presença de fumaça de cigarro, assim a formação dos produtos de oxidação aumentam o número de compostos químicos passíveis de reação com bases do DNA e, conseqüentemente, a formação de lesões como as aqui estudadas.

Novamente, esses dados juntamente com os demais estudos realizados podem auxiliar na compreensão de resultados dos estudos epidemiológicos (ATBC e CARET) nos quais foi observada uma tendência de aumento de câncer de pulmão em indivíduos fumantes suplementados com β -caroteno. Entretanto, é importante ressaltar que segundo dados publicados recentemente (Männistö e col., 2004), o β -caroteno presente em níveis normais na dieta não levou a nenhum aumento no índice de câncer, ao passo que a β -criptoxantina mostrou uma pequena diminuição no risco de câncer pulmonar. Sendo assim, apesar do cigarro ser um fator fortemente indutor do risco de câncer pulmonar, a ingestão de alimentos ricos em β -criptoxantina, como frutas cítricas, pode diminuir o risco mesmo que de maneira bem modesta (Männistö e col. 2004).

5.7 – Comunicação intercelular via junções comunicantes induzida por produtos de oxidação do β -caroteno e da zeaxantina

Carotenóides participam de mecanismos básicos de proliferação celular, sinalizadores de fatores de crescimento, comunicação intercelular via junções comunicantes, ativação da expressão gênica, além de produzirem alterações na expressão de muitas proteínas participantes destes processos como por exemplo, conexinas, ciclinas. A alteração na expressão de proteínas sugere que os carotenóides ou seus derivados podem ativar receptores nucleares além dos receptores de ácido retinóico (Sharoni e col. 2004).

A comunicação intercelular via junções comunicantes (GJC) é estimulada pela regulação da expressão da conexina 43. A comunicação intercelular via junções comunicantes está envolvida no controle de crescimento de células pré-carcinogênicas e um aumento nesta comunicação está correlacionada com uma inibição do crescimento. Os mecanismos biológicos responsáveis pelo controle da comunicação intercelular via junções comunicantes pelos carotenóides ainda não foram totalmente elucidados, entretanto seus metabólitos como carotenóides e retinóides devem ser responsáveis por pelo menos uma parte deste efeito (Stahl e col., 2000).

Nossos experimentos também incluíram o estudo do efeito do β -caroteno e da zeaxantina, assim como de seus produtos de oxidação na comunicação intercelular via junções comunicantes. Neles, verificamos que os produtos oxidados tanto da zeaxantina (1,8 μ M) quanto do β -caroteno (1,8 μ M) levaram a uma indução nas comunicação intercelular comparados aos obtidos pelo controle positivo, ácido retinóico. Já, em concentrações superiores, (18 μ M) foi observada uma diminuição no número de células comunicantes, o que pode estar relacionado com a diminuição da viabilidade das células nestas concentrações. Os resultados indicam que os produtos da oxidação destes carotenóides, quando em baixa concentração, levam a um efeito benéfico para as células, o que não acontece quando em altas concentrações. O β -apo-8'-carotenal também aumentou o número de células comunicantes na concentração utilizada.

Comparando-se os carotenóides β -caroteno e zeaxantina com seus produtos de oxidação (figuras 4.42 e 4.43), verificamos que tanto os carotenóides oxidados quanto os carotenóides de origem apresentaram efeitos semelhantes de indução no número de células comunicantes comparadas ao controle tanto no tratamento por 24 h quanto por 72 h. O aumento do número de células comunicantes nos tratamentos com os produtos oxidados da zeaxantina e do β -caroteno estão ilustrados nas figuras 4.44 e 4.45..

Outros carotenóides oxidados como cantaxantina também levam a um aumento na comunicação celular (Hanusch e col., 1995). Destacamos que o licopeno e seus produtos de oxidação também levaram a um aumento na comunicação intercelular, em estudos semelhantes (Livny e col., 2002; Aust e col., 2003).

Recentemente, foi verificado em cultura celular de células carcinogênicas (10T1/2) que tanto retinóides como carotenóides constituintes da dieta inibiram reversivelmente transformações neoplásticas na fase de pós-iniciação da carcinogênese. Esta atividade se correlaciona fortemente com sua habilidade de aumentar a comunicação intercelular via junções comunicantes pela regulação da expressão do gene CX43 (Conexina 43). As conexinas fazem parte da unidade estrutural das junções comunicantes, organelas que permitem a transferência direta de sinais, nutrientes e de resíduos de produtos entre as células em contato. O gene CX 43 é o membro de maior expressão da família dos genes das junções comunicantes; foi demonstrado sua que falta de expressão é altamente correlacionada a muitas condições pré-malignas e casos de câncer em seres humanos (Bertram, 2004).

Nossos estudos de análise de lesões em DNA e também da comunicação intercelular via junções comunicantes, mostraram dois possíveis efeitos do β -caroteno e de seus derivados: efeito pró-oxidante e protetor. Se por um lado o β -caroteno e alguns de seus produtos de oxidação levam a um aumento no nível das lesões de DNA aqui estudadas, também foi verificado um efeito protetor mostrado nos resultados de comunicação intercelular via junções comunicantes, mostrando que a capacidade dos carotenóides em atuar em diversos tipos de sistemas biológicos é muito ampla.

No contexto de saúde pública, ao mesmo tempo que os benefícios de uma dieta rica em frutas e vegetais deve continuar a ser enfatizada, o caso do β -caroteno mostra um exemplo de advertência para a necessidade de se considerar possíveis efeitos de suplementos isolados da dieta antes de triagens clínicas em massa serem iniciadas. Isto é realmente importante em indivíduos expostos à agentes mutagênicos e carcinogênicos presentes no meio ambiente, como os encontrados na fumaça de cigarro e em componentes industriais. Além disso, antes das triagens clínicas serem iniciadas, uma rigorosa caracterização toxicológica dos agentes preventivos devem ser realizadas, usando modelos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Paolini e col., 2003).

Conclusões

6 – CONCLUSÕES

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem um efeito protetor do β -caroteno contra câncer. Entretanto, estudos epidemiológicos mostram um aumento na incidência de câncer pulmonar em indivíduos fumantes suplementados com β -caroteno (Heinonem & Albanes, 1994; Omenn e col, 1996a, b). Sabe-se que este carotenóide pode sofrer oxidação levando à formação de compostos como aldeídos, entre outros (Handelman, e col., 1991; Padula e col., 1999); estes, por sua vez são capazes de ligarem-se ao DNA, formando adutos (revisado por Loureiro e col., 2002a). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram a possibilidade dos metabólitos do β -caroteno agirem como agentes pró-carcinogênicos (Paolini e col, 1999; Perocco e col, 1999; Salgo e col 1999; Wang & Russell, 1999; Arora e col., 2001; Yeh e col., 2003).

Uma vez que adutos podem ser formados a partir de um número apreciável de agentes mutagênicos e carcinogênicos, vem aumentando o interesse nestes compostos como biomarcadores de exposição ao risco de câncer associado a uma série de fatores como estresse oxidativo, processos inflamatórios e infecciosos.

No presente trabalho, identificamos, caracterizamos e quantificamos a formação do aduto $1,N^2$ - ϵ dGuo como produto da reação da 2'-desoxiguanosina (dGuo) e em DNA com β -caroteno e dois de seus produtos de oxidação: retinal e β -apo-8'-carotenal. Para fins comparativos, também foram quantificados os níveis de outra lesão, que vem sendo utilizada como marcador de oxidação em DNA, a 8-oxodGuo. O aumento de ambas as lesões nos tratamentos com os carotenóides foi verificado.

Para permitir a quantificação de níveis de eteno aduto *in vivo*, foi desenvolvido método ultra-sensível baseado em LC/ESI/MS-MS, que permitiu a quantificação da lesão em DNA na ordem de fentomols.

Estudos com células de pulmão em cultura tratadas com o β -caroteno e seus produtos de oxidação também mostraram aumentos nas duas lesões.

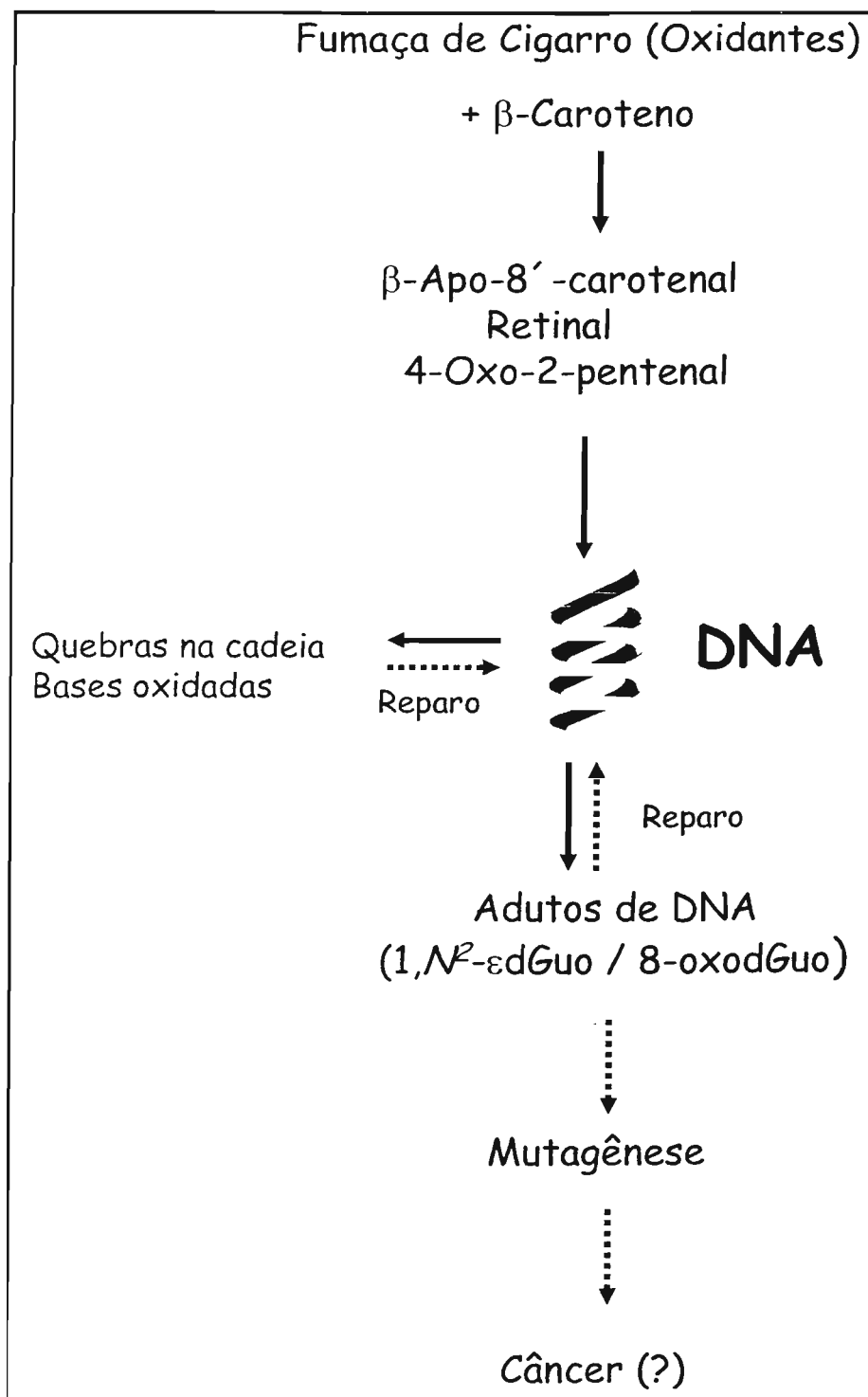
Para comprovação de que os adutos também eram formados *in vivo*, foram quantificados os níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo e de 8-oxodGuo em DNA de pulmão

de ratos expostos à fumaça de cigarro e suplementados com β -caroteno por 7, 30 e 180 dias. Os níveis de $1,N^2$ - ϵ dGuo mostraram-se elevados nos grupos suplementados com β -caroteno comparados ao grupo veículo e também nos grupos suplementados com β -caroteno e expostos à fumaça quando comparados aos grupos apenas expostos à fumaça. Entretanto, não observamos efeito de aumento sinérgico nos níveis de adutos nos animais suplementados com β -caroteno e expostos à fumaça de cigarro quando comparados ao grupo apenas suplementado. Ressalta-se que os estudos com ratos foram efetuados em uma escala piloto e precisam ser ampliados para conclusões definitivas.

Considerando que fumantes provavelmente apresentam níveis mais elevados de produtos de oxidação do β -caroteno que não fumantes (Salgo e col., 1999), e que os adutos $1,N^2$ - ϵ dGuo e 8-oxodGuo são comprovadamente mutagênicos (Moller & Wallin, 1998; Langouët e col., 1997; Langouët e col., 1998), os resultados aqui *in vitro* apresentados, sugerem que essas duas lesões em DNA podem estar envolvidas no mecanismo de carcinogênese em indivíduos suplementados com altas doses de β -caroteno e expostos à oxidantes.

Nossos estudos também mostraram que os produtos de oxidação do β -caroteno são capazes de levar ao aumento da comunicação intercelular via junções comunicantes. Estes dados juntamente com nossos dados que demonstram um aumento na formação de lesões mutagênicas no DNA por esta classe de composto, demonstram que a capacidade dos carotenóides em atuar em sistemas biológicos diferentes é muito ampla.

O esquema a seguir (esquema 6.1) ilustra um possível mecanismo de ação do β -caroteno verificado em nossos estudos.



Esquema 6.1: Possíveis consequências da formação de adutos de DNA frente a exposição de β -caroteno.

Referências Bibliográficas

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKASAKA, S., GUENGERICH, F.P. (1999) Mutagenicity of site-specific located 1,N²-ethenoguanine in Chinese hamster ovary cell chromosomal DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 501-507.
- ALE-AGHA, N., STAHL, W., SIES, W. (2002) (-)-Epicatechin effects in rat liver epithelial cells: stimulation of gap junctional communication and counteraction of its loss due to the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Biochemical Pharmacology* **63**, 2145-2149.
- AMES, B.N., GOLD, L.S. (1991) Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat. Res.* **250**, 3-16.
- AMES, B.N., GOLD, L.S., WILLETT, W.C. (1995) The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5258-5265.
- ANGELOFF, A., DUBEY, I., PRATVIEL, G., BERNADOU, J., MEUNIER, B. (2001) Characterization of a 5'-aldehyde terminus resulting from the oxidative attack at C5' of a 2-deoxyribose on DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 1413-1420.
- APGAR, J., MAKDANI, D., SOWELL, A.L., GUNTER, E.W., HEGAR, A., POTT, W., RAO, D., WILCOX, A., SMITH, J. C. (1996) Serum carotenoid concentrations and their reproducibility in children in Belize. *Am. J. Clin. Nutr.* **64**, 726-730.
- ARIF, J.M., VADHANAM, M.V., De GROOT, A.J.L., VAN ZEELAND, A.A., GAIROLA, C.G., GUPTA, R.C. (2001) Effect of cigarette smoke exposure on the modulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine in rat lungs as analyzed by P-32-Postlabeling and HPLC-ECD. *Int. J. Onc.* **19**, (4), 763-766.
- ARORA, A., WILLIHITE, C.A., LIEBLER, D.C. (2001) Interactions of beta-carotene and cigarette smoke in human bronchial epithelial cells. *Carcinogenesis* **22**, (8), 1173-1178.
- AUGUSTO, O., HIX, S., MORAIS, M.S., VASQUEZ-VIVAR, J. (1995) Free radical reactions: Formation of adducts with biomolecules and their biological significance. *Ciência e cultura* **47**, (5/6), 280-287.
- AUGUSTO, O., BONINI, M.G., AMANSO, A.M., LINARES, E., SANTOS, C.C.X., DE MENEZES, S.L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, (9), 841-859.

- AUST, O., ALE-AGHA, N., ZHANG, L., WOLLERSEN, H., SIES, H., STAHL, W. (2003) Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication. *Food Chem. Toxicol.* **41**, (10), 1399-1407.
- AWADA ,M., DEDON, P.C. (2001) Formation of the 1,*N*²-Glyoxal Adduct of Deoxyguanosine by Phosphoglycolaldehyde, a product of 3'-deoxyribose oxidation in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **14** (9), 1247-1253.
- BAKER, D.L., DROL, E.S., JACOBSEN, N., LIEBLER, D.C. (1999) Reactions of β-carotene with cigarette smoke oxidants. Identification of carotenoid oxidation products and evaluation of the prooxidant/antioxidant effect. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 535-543.
- BARTLEY, G.E., SCOLNIK, P.A. (1995). Plant Carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* **7**, 1027-1038.
- BARTSCH, H., BARBIN, A., MARION, M.-J., NAIR, J. E GUICHARD, Y. (1994) Formation, detection, and role in carcinogenesis of ethenobases in DNA. *Drug Metab. Rev.* **26**, 349-371.
- BARTSCH, H. (1999). Exocyclic adducts as new risk markers for DNA damage in man. In: Exocyclic DNA adducts in Mutagenesis and Carcinogenesis, B. Singer and H. Bartsch, eds. Lyon, France: IARC Sci. Publ. No. 150, pp 1-6.
- BARTSCH, H., NAIR, J., OWEN, R.W. (1999) Dietary polyunsaturated fatty acids and cancer of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* **12**, 2209-2218.
- BARTSCH, H., NAIR, J. (2000) New DNA-based biomarkers for oxidative stress and cancer chemoprevention studies. *Eur. J. Cancer* **36**, 1229-1234.
- BARTSCH, H., NAIR, J., OWEN, R.W. (2002) Exocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis: potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants. *Biol. Chem.* **383**, 915-921.
- BARUA, A.B., OLSON, J.A. (2000) β-carotene is converted primarily to retinoids in rats *in vivo*. *J. Nutr.* **130**, (8), 1996-2001.
- BASU, A.K., WOOD, M.L., NIEDERNHOFER, L.J., RAMOS, L.A., ESSIGMANN, J.M. (1993) Mutagenic and genotoxic effects of three vinyl chloride-induced DNA lesion: 1,*N*⁶-ethenoadenine, 3,*N*⁴-ethenocytosine and 4-amino-5-(imidazol 2-yl) imidazole. *Biochemistry* **32**, 12793-12801.

-
- BERTRAM, J.S. (1999) Carotenoids and gene regulation. *Nutr. Rev.* **57**, 182-191.
- BERTRAM, J.S. (2004) Dietary carotenoids, connexins and cancer: what is the connection? *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 985-989.
- BIERER, T.L., MERCHEN, N.R., ERDMAN, J.W. Jr. (1995) Comparative absorption and transport of five common carotenoids in preruminant calves. *J. Nutr.* **125**, 1569-1577.
- BIESALSKI, H.K., OBERMÜELLER-JEVIC, U.C. (2001) UV light, beta-carotene and human skin-beneficial and potentially harmful effects. *Arch. Biochem. Biophys.* **389**, (1), 1-6.
- BLAKELY, S.R., SLAUGHTER, L., ADKINS, J., KNIGHT, E.V. (1988) Effects of beta-carotene and retinyl palmitate on corn oil-induced superoxide dismutase and catalase in rats. *J. Nutr.* **118**, (2), 152-158.
- BOITEUX, S., GAJEWSKI, E., LAVAL, J., DIZDAROGLU, M. (1992) Substrate specificity of Escherichia coli FPG protein (formamidopyrimidine-DNA-glycosylase): excision of purine lesion in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry*, **31**, 106-110.
- BOITEUX, S., LAVAL, J. (1997) Repair of oxidized purines in DNA. In: Hickson, I.D. (Ed.), Base excision repair of DNA damage. Landes Biosciences Paris, 31-44.
- BOITEUX, S., GELLON, L., GUIBOURT, N. (2002) Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: Interplay of DNA repair and replication mechanisms. *Free. Radic. Biol. Med.* **32**, (12), 1244-1253
- BRAITHWAITE, E., WU, X., WANG, Z. (1999) Repair of DNA lesions: mechanisms and relative repair efficiencies. *Mutat. Res.* **428**, (1-2), 207-219.
- BREEN, A. P., AND MURPHY, J. A. (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 1033-1077.
- BURRI, B.J. (1997) Beta - Carotene and human health: a review of current research, *Nutr. Res.* **17**, 3. 547-580.
- BURROWS, C.J., MULLER, J.G. (1998) Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. *Chem. Rev.* **98**, 1109-1151.
- BURTON, G.W. (1989), Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutr.* **119**, 109-111.
- BURTON, G.W., INGOLD, K.U. (1984), β -carotene an unusual type of lipid antioxidant. *Science* **224**, 569-573.

- CADET, J.; BERGER, M.; DOUKI, T.; MORIN, B.; RAOUL, S.; RAVANAT, J.-L.; SPINELLI, S. (1997) Effects of UV and Visible Radiation on DNA-Final Base Damage, *Biol. Chem.* **378**, 1275-1286.
- CADET, J., DOUKI, T., FRELON, S., SAUVAIGO, S., POUGET, J.-P., RAVANAT, J.-L. (2002) Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS/MS measurement. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 441-449.
- CADET, J., DOUKI, T., GASPARUTTO, D., RAVANAT, J.-L. (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.* **531**, 5-23.
- CARVALHO, V.M., DI MASCIO, P., CAMPOS, I.P.A.A.; DOUKI, T., CADET, J., MEDEIROS, M.H.G. (1998) Formation of 1,N⁶-Etheno-2'-deoxyadenosine Adducts by *trans*, *trans* – 2,4-Decadienal, *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1042-1047.
- CARVALHO, V.M., ASAHARA, F.; DI MASCIO, P., CAMPOS, I.P.A. , CADET, J., MEDEIROS, M.H.G. (2000) Novel 1,N⁶-Etheno-2'-deoxyadenosine adducts from lipid peroxidation products. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 397-405.
- CHEN, H.-J., CHUNG, F.-L. (1996) Epoxidation of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 306-312.
- CHEN, H.-J.C., CHIANG, L.-C., TSENG, M.-C., ZHANG, L.L., NI, J., CHUNG, F.-L. (1999) Detection and quantification of 1,N⁶-ethenoadenine in human placental DNA by mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 1119-1126.
- CHEN, H.-J.C., HONG, C.L., WU, C.F., CHIU, W.L. (2003) Effect of cigarette smoking on urinary 3,N⁴-Ethenocytosine levels measured by gas chromatography/mass spectrometry. *Toxicol. Sci.* **76**, (2), 321-327.
- CHEN, H.-J. C., WU, C.-F., HONG, C.-L., CHANG, C.-M. (2004) Urinary excretion of 3,N⁴-etheno-2'-deoxycytidine in humans as a biomarker of oxidative stress: association with cigarette smoking. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 896-903.
- CHEN, H.-J. C., CHANG, C.-M. (2004) Quantification of urinary excretion of 1,N⁶-ethenoadenine, a potential biomarker of lipid peroxidation, in humans by stable isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionization – tandem mass spectrometry: comparison with gas chromatography – mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 963-971.

- CHENG, K.C., PRESTON, B.D., CAHILL, D.S., DOSANJH, M.K., SINGER, B., LOEB, L.A. (1991) The vinyl chloride DNA derivative N^2 , 3-ethenoguanine produces G \rightarrow A transitions in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9974-9978.
- CHUANG, C.Y., LEE, C.C., CHANG, Y.K., SUNG, F.C. (2003) Oxidative DNA damage estimated by urinary-8-hydroxydeoxyguanosine: influence of taxi driving, smoking and areca chewing. *Chemosphere* **52**, (7), 1163-1171.
- CHUNG, F.-L., CHEN, H.-J. C., NATH, R. G. (1996) Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis* **17**, 2105-2111.
- CHURCH, T., PRYOR, W.A. (1985) Free Radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.* **64**, 111-126.
- CHURCHWELL, M.I., BELAND, F.A., DOERGE, D.R. (2002) Quantification of multiple DNA adducts formed through oxidative stress using liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **15**, 1295-1301.
- CIROUSSEL, F., BARBIN, A., EBERLE, G. E BARTSCH, H. (1990) Investigations on the relationship between DNA ethenobase adduct levels in several organs of vinyl chloride-exposed rats and cancer susceptibility. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 1109-1113.
- CLINTON, S.K. (1998) Lycopene: Chemistry, biology and implications for human health and disease. *Nutr. Reviews* **56**, (2), 35-51.
- COLLINS, A.R., OLMEDILLA, B., SOUTHON, S., GRANADO, F., DUTHIE, S.J. (1998) Serum carotenoids and oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis* **19**, 2159-2162.
- COLLINS, R.A., HORVATHOVA, E. (2001) Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: application of the comet assay. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 337-341.
- COMHAIR, S.A.A., ERZURUM, S.C. (2002) Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **283**, L246-L255.
- CONN, P.F., SCHALCH, W. AND TRUSCOTT, T.G., (1991) The singlet oxygen carotenoid interaction. *J. Photochem. Photobiol. B.* **11**, 41-47.
- COOKE, M.S., EVANS, M.D., DIZDAROGLU, M., LUNEC, J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *The FASEB Journal* **17**, 1195-1214.

- DAVIES, K.J.A. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol Chem.* **262**, (20), 9895-9901.
- DEALY, C.N., BEYER, E.C., KOSHER, R.A. (1994) Expression patterns of mRNAs for the gap junction proteins connexin43 and connexin 42 suggest their involvement in chick limb morphogenesis and specification of the arterial vasculature. *Dev. Dyn.* **199**, (2), 156-167.
- DE FLORA, S., D'AGOSTINI, F., BALANSKY, R., CAMOIRANO, A., BENNICELLI, C., BAGNASCO, M., CARTIGLIA, C., TAMPA, E., LONGOBRDI, M.G., LUBET, R.A., IZZOTTI, A. (2003) Modulation of cigarette smoke-related end points in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* **523-524**, 237-252.
- DEMARINI, D.M. (2004) Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat. Res.* **567**, (2-3), 447-474.
- DEMING-ADAMS, B., GILMORE, A.M. AND ADAMS, W.W. (1996) In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* **10**, 403-412.
- DI MASCIO, P., KAISER, S., SIE, H. (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher *Arch. Biochem. Biophys.* **274**, 532-538.
- DOERGE, D.R., CHURCHWELL, M.I., FANG, J.L., BELAND, F.A. (2000) Quantification of Etheno-DNA Adducts using liquid chromatography, on line sample processing and electrospray tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 1259-1264.
- DONAHUE, H.J., LI, Z., ZHOU, Z., YELLOWLEY, C.E. (2000) Differentiation of human fetal osteoblastic cells and gap junctional intercellular communication. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **278**, (2), C315-322.
- DONALDSON, P., ECKERT, R., GREEN, C., KISTLER, J. (1997) Gap junction channels: new roles in disease. *Histol. Histopathol.* **12**, 219-231.
- EBERLE, G., BARBIN, A., LAIB, R. J., CIROUSSEL, F., THOMALE, J., BARTSCH, H. E RAJEWSKY, M. F. (1989) 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine and 3,N⁴-etheno-2'-deoxycytidine detected by monoclonal antibodies in lung and liver DNA of rats exposed to vinyl chloride. *Carcinogenesis* **10**, 209-212.
- EHRENBERG, L., OSTERMAN-GOLKAR, S., SEGERBÄCK, D., SVENSSON, K., CALLEMAN, C.J. (1977) Evaluation of genetic risks of alkylating agents. III. Alkylation of haemoglobin after metabolic conversion of ethane oxide in vivo. *Mutat. Res.* **45**, 175-184.

- EICKER, J., KÜRTEEN, V., WILD, S., RISS, G., GORALCZYK, R., KRUTMANN, J., BERNEBURG, M. (2003) Beta-carotene supplementation protects from photoaging-associated mitochondrial DNA mutation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2**, (6), 655-659.
- EISENBRAND, G., SCHUHMACHER, J., GÖLZER, P. (1995) The influence of glutathione and detoxifying enzymes on DNA damage induced by 2-alkenals in primary rat hepatocytes and human lymphoblastoid cells. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 40-46.
- EL-AGAMEY, A., LOWE, G.M., MCGARVEY, D.J., MORTENSEN, A., PHILLIP, D.M., TRUSCOTT, G., YOUNG, A.J. (2004) Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **430**, 37-48.
- ERDMAN, J.J.W., BIERER, T.L., GUGGER, E.T. (1993) Absorption and transport of carotenoids. *Ann. NY Acad. Sci.* **691**, 76-85.
- ESTERBAUER, H., SCHAUR, R.J., ZOLLNER, H. (1991) Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* **11**, 81-128.
- FARCHI, S., FORASTIERE, F., PISTELLI, R., BALDACCI, S., SIMONI, M., PERUCCI, C.A., VIEGI, G.; ON BEHALF OF THE SEASD GROUP (2001) Exposure to environmental tobacco smoke is associated with lower plasma beta-carotene levels among nonsmoking women married to a smoker. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **10**, (8), 907-909.
- FARMER, P.B. (2004) Exposure biomarkers for the study of toxicological impact on carcinogenic processes. IARC Sci. Publ. 157, pp. 71-90.
- FEDTKE, N., BOUCHERON, J.A., TURNER, M.J.JR. E SWENBERG, J.A. (1990a) Vinyl chloride-induced DNA adducts. I: Quantitative determination of *N*²,3-ethenoguanine based on electrophore labeling. *Carcinogenesis* **11**, 1279-1285.
- FEDTKE, N., BOUCHERON, J.A., WALKER, V.E. E SWENBERG, J.A. (1990b) Vinyl chloride-induced DNA adducts. II: Formation and persistence of 7-(2'-oxoethyl)guanine and *N*²,3-ethenoguanine in rat tissue DNA. *Carcinogenesis* **11**, 1287-1292.
- FERNANDO, R.C., NAIR, J., BARBIN A., MILLER, J. A., BARTSCH, H. (1996) Detection of 1,*N*⁶-ethenodeoxyadenosine and 3,4*N*⁴-ethenodeoxycytidine by immunoaffinity/³²P-postlabelling in liver and lung DNA of mice treated with ethyl carbamate (urethane) or its metabolites. *Carcinogenesis* **17**, 1711-1718.

- FIALA, E.S., CLIFFORD, C.C., MATHIS, J.E., (1989), Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Res.* **49**, 5518-5522.
- FLOYD, R.A.; WEST, M.S.; ENEFF, K.L.; HOGSETT, W.E.; TINGEY, D.T. (1988). Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA. *Arch. Biochem. Biophys.* **262**, 266-272.
- FOLKMAN, W., KUSMIEREK, J.T., SINGER, B. (1990) A new one-step method for the preparation of 3',5'-bisphosphates of acid-labile deoxynucleosides. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 536-539.
- FORGE, A., BECKER, D., CASALOTTI, S., EDWARDS, J., EVANS, W.H., LENCH, N., SOUTER, M. (1999) Gap junctions and connexin expression in the inner ear. *Novartis Found Symp.* **219**, 134-150.
- FORSSBERG, A., LINGEN, C.H.R., ERNSTER, L., LINDBERG, O. (1958) Modification of the X-irradiation syndrome by lycopene, *Experimental Cell Research* **16**, 7-14.
- FUJITA, M., SANO, M., YOSHINO, K., TOMITA, I. (1994) Effects of aldehyde dehydrogenase and glutathione on the degradation of (E)-4-hydroxy-2-nonenal and N-hexanal in rat liver. *Biochem. Mol. Biol. Internat.* **32**, 429-434.
- GAMBOA-PINTO, A.J., ROCK, C.L., FERRUZZI, M.G., SCHOWINSKY, A.B., SCHWARTZ, S.J. (1998) Cervical tissue and plasma concentrations of alpha-carotene and beta-carotene in women are correlated. *J. Nutr.* **128**, (11), 1933-1936.
- GANN, P.H., MA, J., GIOVANNUCCI, E., WILLETT, W., SACKS, F.M., HENNEKENS, C.H., STAMPFER, M.J. (1999) Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res.* **59**, 1225-1230.
- GÄRTNER, C., STAHL, W., SIES, H. (1997) Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**, 116-122.
- GENTIL, A., RENAULT, G., MADZAK, C., MARGOT, A., CABRAL-NETO, J.B., VASSEUR, J.J., RAYNER, B., IMBACH, J.L., SARASIN, A. (1990) Mutagenic properties of a unique abasic site in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 704-710.
- GESSLER, N.N., GOMBOEVA, S.B., SHUMAEV, K.B., BYKHOVSKII, V.Y., LANKIN, V.Z. (2001) Free radical lipid peroxidation inhibits enzymatic conversion of beta-carotene into vitamin A. *Bull. Exp. Biol. Med.* **131**, (5), 451-453.

- GIOVANNUCCI, E., ASCHERIO, A., RIMN, E.B., STAMPFER, M.J., COLDITZ, G.A., WILLETT, W.C. (1995) Intake of carotenoids and retinal in relation to risk of prostate cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 1767-1776.
- GIOVANNUCCI, E. (1999) Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: Review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 317-331.
- GLISE, D., RIONDEL, J., FAVIER, A. (1998) Comparative distribution of b-carotene and lycopene after intraperitoneal administration in mice. *In Vivo* **12**, 447-454.
- GOLDSCHMIDT, B.M., BLAZEJ, T.P., VAN DUUREN, B.L. (1968) The reaction of guanosine and deoxyguanosine with glyceraldehyde *Tetrahedron Lett.* **13**, 1583-1586.
- GONZALEZ-RECHE, L.M., KOCH, H.M., WEISS, T., MÜLLER, J., DREXLER, H., ANGERER, J. (2002) Analysis of ethenoguanine adducts in human urine using high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Toxicology Letters* **134**, 71-77.
- GOPALAKRISHNA, R., CHEN, Z.-H., GUNDIMEDA, U. (1994) Tobacco smoke tumor promoters, catechol and hydroquinone, induce oxidative regulation of protein kinase C and influence invasion and metastasis of lung carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12233-12237.
- GOW, A.J., ISCHIROPOULOS, H. (2001) Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *J. Cell Physiol.* **187**, (3), 277-282.
- GRADELET, S., LECLERC, J., SIESS, M.H., ASTORG, P. (1996), Beta-*apo*-8'-carotenal, but not beta-carotene, is a strong inducer of liver cytochromes P4501A1 and 1A2 in rat, *Xenobiotica* **26**, 909-919.
- GROS, L., ISHCENKO, A.A., SAPARBAEV, M. (2003) Enzymology of repair of etheno-adducts. *Mutat. Res.* **531**, 219-229.
- GUENGERICH, F.P. (1992) Roles of the vinyl chloride oxidation products 2-chlorooxirane and 2-chloroacetaldehyde in the in vitro formation of etheno adducts of nucleic acid bases. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 2-5.
- GUENGERICH, F.P. (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, (6), 611-650.
- GUICHARD, Y., EL GHISSASSI, F., NAIR, J., BARTSCH, H., BARBIN, A. (1996) Formation and accumulation of DNA ethenobases in adult Sprague-Dawley rats exposed to vinyl chloride. *Carcinogenesis* **17**, 1553-1559.

- HADLEY, C.W., CLINTON, S.K., SCHWARTZ, S.J. (2003) The consumption of processed tomato products enhances plasma lycopene concentrations in association with a reduced lipoprotein sensitivity to oxidative damage. *J. Nutr.* **133**, (3), 727-732.
- HAEGELE, A.D., GILLETE, C., O'NEILL, C., WOLFE, P., HEIMENDINGER, J., SEDLACEK, S., THOMPSON H.J. (2000) Plasma xanthophylls carotenoids correlate inversely with indices of oxidative DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **9**, (4), 421-425.
- HAILA, K., HOPIA, A., HEINONEN, M. (2000) Effects of β -carotene and retinal on the formation of methyl linoleate hydroperoxides. *Europ. Lip. Science and Technol.* **102**, (1), 31-36.
- HALLIWELL, B. (1987) Oxidants and human disease: Some new concepts. *FASEB J.* **1**, 358-364.
- HALLIWELL, B. (1990) How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res.* **9**, 1-32.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford Science Publications.
- HANDELMAN, G., VAN KUIJK, F. J. G.M.; CHATTERJEE, A., KRINSKY, N. I. (1991) Characterization of products formed during the autoxidation of β -carotene, *Free Radic. Biol Med.* **10**, 427-437.
- HANDELMAN, G.J. (2001) The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition* **17**, (10), 818-822.
- HANG, B., CHENNA, A., RAO, S., SINGER, B. (1996) 1,*N*⁶-ethenoadenine and 3,*N*⁴-ethenocytosine are excised by separate human DNA glycosylases. *Carcinogenesis* **17**, 155-157.
- HANG, B., SINGER, B., MARGISON, G. P., ELDER, R.H. (1997). Targeted deletion of alkylpurine-DNA-*N*-Glycosylase in mice eliminates repair of 1,*N*⁶-ethenoadenine and hypoxanthine but not of 3,*N*⁴-ethenocytosine or 8-oxoguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 12869-12874.
- HANSEN, M.B., NIELSEN, S.E., BERG, K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth / cell kill. *J. Immun. Meth.* **119**, 203-210.
- HANUSCH, M., STAHL, W., SCHULZ, W.A., SIES, H. (1995) Induction of gap junctional communication by 4-oxoretinoic acid generated from its precursor canthaxanthin. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 423-428.

- HEINONEN, O.P., ALBANES, D. (1994) The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N. Engl. J. Med.* **330**, 15, 1029-1035.
- HELBOCK, H.J., BECKMAN, K.B., AMES, B.N. (1999). 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol.* **300**, 156-166.
- HENNEKENS, C.H., BURING, J.E., MANSON, J.E., STAMPFER, M., ROSNER, B., COOK, N.R., BELANGER, C., LaMOTTE, F., GAZIANO, J.M., RIDKER, P.M., WILLET, W., PETO, R. (1996) Lack of effect of long-term supplementation with β -carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *New Engl. J. Med.* **334**, 1145-1149.
- HILLESTROM, P.R., HOBERG, A.M., WEIMANN, A., POULSEN, H.E. (2004) Quantification of 1,*N*⁶-etheno-2'-deoxyadenosine in human urine by column-switching LC/APCI-MS/MS. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, (11), 1383-1392.
- HOLDER, J.W., ELMORE, E., BARRETT, J.C., (1993) Gap junction function and cancer. *Cancer Res.* **53**, 3475-3485.
- HOSSAIN, M.Z., WILKENS, L.R., MEHTA, P.P., LOEWENSTEIN, W., BERTRAM, J.S. (1989) Enhancement of gap junctional communication by retinoids correlates with their ability to inhibit neoplastic transformation. *Carcinogenesis* **10**, (9), 1743-1748.
- HOSSAIN, M.Z., ZHANG, L-X., BERTRAM, J.S. (1993) Retinoids and carotenoids upregulate gap-junctional communication: correlation with enhanced growth control and cancer prevention. *Progress in Cell Research* **3**, 301-309.
- HOTZ-WAGENBLATT, A., SHALLOWAY, D. (1993) Gap junctional communication and neoplastic transformation. *Crit. Rev. Oncog.* **4**, 541-558.
- HURST, J.S., CONTRERAS, J.E., SIEMS, W.G., VAN KUIJK, F.J. (2004) Oxidation of carotenoids by heat and tobacco smoke. *Biofactores* **20**, (1), 23-35.
- IMALAY, J.A., LINN, S. (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**, 1302-1309.
- IYAMA, T., TAKASUGA, A. AZUMA, M. (1996) β -carotene accumulation in mouse tissues and a protective role against lipid peroxidation. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **66**, 301-305.
- JACKSON, A.L., CHEN, R., LOEB, L.A. (1998) Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 12468-12473.
- JAISWAL, M., LIPINSKI, L.J., BORH, V.A., MAZUR, S.J. (1998) Efficient in vitro repair of 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine by human cell extracts: involvement of multiple pathways. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2184-2191.

- KANEKO, T., KAJI, K., MATSUO, M. (1988) Cytotoxicities of a linoleic acid hydroperoxide and its related aliphatic aldehydes toward cultured human umbilical vein endothelial cells. *Chem. Biol. Interactions* **63**, 295-304.
- KASAI, H., YAMAIZUMI, Z., BERGER, M., AND CADET, J. (1992) Photosensitized formation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in DNA by riboflavin a non-singlet oxygen mediated reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9692 – 9694.
- KENNEDY, T.A. ., LIEBLER, D.C. (1992) Peroxyl radical scavenging by beta-carotene in lipid bilayers. Effect of oxygen partial pressure. *J. Biol. Chem.* **267**, 4658-4663.
- KHOPDE, S.M., PRIYADARSINI, K.I., MUKHERJEE, T., KULKAMI, P.B., SATAV, J.G., BHATTACHARYA, R.K. (1998) Does β -carotene protect membrane lipids from nitrogen dioxide? *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 66-71.
- KIEFER, C., HESSEL, S., LAMPERT, J.M., VOGT, K., LEDERER, M.O., BREITHAUPT, D.E., VON LINTIG, J. (2001) Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J. Biol. Chem.* **276**, (17), 14110-14116.
- KIKUGAWA, K., HIRAMOTO, K., HIRAMA, A. (1999) Beta-carotene generates thiobarbituric acid-reactive substances by interaction with nitrogen dioxide in air. *Free Radic. Res.* **31**, (6), 517-523.
- KIM, S.J., NARA, E., KOBAYASHI, H., TERAOKA, J., NAGAO, A. (2001) Formation of cleavage products by autoxidation of lycopene. *Lipids* **36**, (2), 191-199.
- KIM, J-E., CHOI, S., YOO, J-A., CHUNG, M-H. (2004) 8-oxoguanine induces intramolecular DNA damage but free 8-oxoguanine protects intermolecular DNA from oxidative stress. *FEBS Letters* **556**, 104-110.
- KINNULA, V.L., CRAPO, J.D. (2003) Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **167**, 1600-1619.
- KISTLER, J., LIN, J.S., BOND, J., GREEN, C., ECKERT, R., MERRIMAN, R., TUNSTALL, M., DONALDSON, P. (1999) Connexins in the lens: are they to blame in diabetic cataractogenesis? *Novartis Found Symp.* **219**, 97-108: discussion 108-112.
- KLEINJANS, J.C.S., van HERWIJNEN, M.H.M., van MAANEN, J M.S., MAAS, L.M., de KOC, M.C.M., MOONEN, H.J.J., BRIEDÉ, J.J. (2004) In vitro investigations into the interaction of β -carotene with DNA: evidence for the role of carbon-centered free radicals. *Carcinogenesis*, **25**, (7), 1249-1256.

- KLIPSTEIN-GROBUSCH, K., LAUNER, L.J., GELEIJNSE, J.M., BOEING, H., HOFMAN, A., WITTEMAN, C.M. (2000) Serum carotenoids and atherosclerosis – The Rotterdam Study, *Arteriosclerosis*, **148**, 49-56.
- KLUNGLAND, A., ROSEWELL, I., HOLLENBACH, S., LARSEN, E., DALY, G., EPE, B., SEEBERG, E., LINDAHL, T., BARNES, D.E. (1999) Accumulation of premutagenic DNA lesion in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13300-13305.
- KOC, H., SWENBERG, J.A. (2002) Applications of mass spectrometry for quantitation of DNA adducts. *J. of Chromatography*, **778**, 323-343.
- KOWALCZYK, P., CIESLA, J., M., KOMISARSKI, M., KUSMIEREK, J.T., TUDEK, B. (2004) Long-chain adducts of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal to DNA bases cause recombination, base substitutions and frameshift mutation in M13 phage. *Mutat. Res.* **550**, 33-48.
- KOCHETKOV, N.K., SHIBAEV, V.N., KOST, A.A. (1971) New reaction of adenine and cytosine derivatives, potentially useful for nucleic acid modifications. *Tetrahedron Lett.* **22**, 1993-1996.
- KRINSKY, N.I., CORNWELL, D.G., ONCLEY, J.L., (1958) The transport of vitamin A and carotenoids in human plasma., *Arch. Biochem. Biophys.* **73**, 233-246.
- KRINSKY, N.I. (1989), Antioxidant functions of carotenoids. *Free Rad. Biol. Med.* **7**, 617-635.
- KRINSKY, N.I. (1993), Actions of carotenoids in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.* **13**, 561-587.
- KRINSKY, N.I. (2001) Carotenoids as Antioxidants. *Nutrition.* **17**, 815-817.
- KRINSKY, N.I., YEUM, K-J. (2003) Carotenoid-radical interactions. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **305**, 754-760.
- KRUTOVSKIKH, V., ASAMOTO, M., TAKASUKA, N., MURAKOSHI, M. (1997) Differential dose-dependent effects of alpha-carotene and lycopene on gap junctional intercellular communication in rat liver in vivo. *Jpn. J. Cancer Res.* **88**, 1121-1124.
- KUSMIEREK, J.T., FOLKMAN, W., SINGER, B. (1989) Synthesis of $N^2,3$ -ethenodeoxyguanosine, $N^2,3$ -ethenodeoxyguanosine 5'-phosphate, and $N^2,3$ -ethenodeoxyguanosine 5'-triphosphate. Stability of the Glycosyl bond in the monomer and in Poly (dF, εdG-dC). *Chem. Res. Toxicol.* **2**, 230-233.
- KUSMIEREK, J.T., SINGER, B. (1992) $1,N^2$ -ethenodeoxyguanosine: properties and formation in chloroacetaldehyde-treated polynucleotides and DNA. *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 634-638.

- LAMBERT, L.A., KOCH, W.H., WAMER, W.G., KORNHAUSER, A. (1990), Antitumor activity in skin of Skh and Sencar mice by two dietary beta carotene formulations. *Nutr. Cancer* **13**, 213-221.
- LANGOUËT, S., MÜLLER, M., GUENGERICH, F.P. (1997) Misincorporation of dNTPs opposite 1,*N*²-Ethenoguanine and 5,6,7,9-Tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo [1,2-*a*] purine in oligonucleotides by *Escherichia coli* polymerases I exo⁻ e II exo⁻, human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase, and rat polymerase β. *Biochemistry* **36**, 6069-6079.
- LANGOUËT, S., MICAN, A.N., MÜLLER, M., FINK, S.P., MARNETT, L.J., MUHLE, S.A., GUENGERICH, F.P. (1998) Misincorporation of nucleotides opposite five-membered exocyclic ring guanine derivatives by *Escherichia coli* Polymerases *in vitro* and *in vivo*: 1, *N*²-Ethenoguanine, 5,6,7,9-Tetrahydro-9-oxoimidazo[1,2-*a*] purine, and 5,6,7,9- Tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo[1,2-*a*] purine. *Biochemistry* **37**, 5184-5193.
- LAWRENCE, C.W., BORDEN, A., BANERJEE, S.K., LE CLERC, J.E. (1990) Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in a single-stranded vector. *Nucleic Acids Res.* **18**. 2153-2157
- LEANDERSON, P., TAGESSON, C. (1992) Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells: Role of hydroxy radicals and endonuclease activation. *Chem. Biol. Interact.* **81**, 197-208.
- LEE, B.M., LEE, S.K., KIM, H.S. (1998) Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, β-carotene and red ginseng). *Cancer Letters* **132**, 219-227.
- LEE, C.M., BOILEAU, A.C., BOILEAU, T.W.M., WILLIAMS, A.W., SWANSON, K.S., HEINTZ, K.A., ERDMAN, Jr, J. (1999) Review of animal models in carotenoid research. *J. Nutr.*, **129**, (12), 2771-2777.
- LEE, S.H., RIDGEN, D., BIBLE, R.H., HADJU, E. (2000) Characterization of 2'-deoxyadenosine adduct derived from 4-oxo-2-nonenal, a novel product of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 1195-1204.
- LEIPOLD, M.D., WORKMAN, H., MULLER, J.G., BURROWS, C.J., DAVID, S.S. (2003) Recognition and removal of oxidized guanines in duplex DNA by the excision repair enzymes hOGG1, yOGG1 and yOGG2. *Biochemistry*, **42**, (38), 11373-11381.
- LEONARD, N.J. (1992) Etheno-bridged nucleotides in structural diagnosis and carcinogenesis. *Biochem. Mol. Biol.* **3**, 273-297.

- LEVIN, G., YESHURUN, M., MOKADY, S. (1997) In vivo antiperoxidative effect of 9-*cis* β -carotene compared with that of all-*trans* isomer. *Nutr. Cancer* **27**, 293-297.
- LIM, P., WUENSCHHELL, G.E., HOLLAND, V., LEE, D.H., PFEIFER, G.P., RODRIGUEZ, H., TERMINI, J. (2004) Peroxyl radical mediated oxidative DNA base damage: implications for lipid peroxidation induced mutagenesis. *Biochemistry* **43**, 15339-15348.
- LINTIG, J., WYSS, A. (2001) Molecular analysis of vitamin A formation: cloning and characterization of β , β -carotene-15, 15'-dioxygenases. *Arch. Biochem. Biophys.* **385**, (1) 47-52.
- LIU, Z., YOUNG-SCIAME, R., HECHT, S.S. (1996) Liquid chromatography--electrospray ionization mass spectrometric detection of an ethenodeoxyguanosine adduct and its hemiaminal precursors in DNA reacted with alpha-acetoxy-*N*-nitrosopiperidine and cis-4-Oxo-2-pentenal. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 774-780.
- LIU, C., WANG, X.D., BRONSON, R.T., SMITH, D.E., KRINSKY, N.I., RUSSELL, R.M. (2000) Effects of physiological versus pharmacological beta-carotene supplementation on cell proliferation and histopathological changes in the lungs of cigarette smoke-exposed ferrets. *Carcinogenesis* **21**, (12), 2245-2253.
- LIU, C., RUSSELL, R.M., WANG, X.-D. (2003) Exposing ferrets to cigarette smoke and a pharmacological dose of β -carotene supplementation enhance in vitro retinoic acid catabolism in lungs via induction of cytochrome P450 enzymes. *J. Nutr.* **133**, 173-179.
- LIU, C., RUSSELL, R.M., WANG, X.D. (2004a) Alpha-tocopherol and ascorbic acid decrease the production of beta-apo-carotenals and increase the formation of retinoids from beta-carotene in the lung tissues of cigarette smoke exposed ferrets in vitro. *J. Nutr.* **134**, (2), 426-430.
- LIU, C., RUSSELL, R.M., WANG, X.D. (2004b) Low dose beta-carotene supplementation of ferrets attenuates smoke induced lung phosphorylation of JNK, p38, MAPK, and p53 proteins. *J. Nutr.* **134**, (10), 2705-2710.
- LIVNY, O., KAPLAN, I., REIFEN, R., POLAK-CHARCON, S., MADAR, Z., SCHWARTZ, B. (2002) Lycopene inhibits proliferation and enhances gap-junction communication of KB-1 human oral tumor cells. *J. Nutr.* **132**, (12), 3754-3759.
- LOMNISKI, L., GROSSMAN, S., BERGMAN, M., SOFER, Y., SKLAN, D. (1997) In vitro and in vivo effects of β -carotene on rat epidermal lipoxygenases. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **67**, 407-414.

- LOUREIRO, A.P., DI MASCIO, P., GOMES, O. F, MEDEIROS, M.H.G., (2000) *trans, trans*-2,4-decadienal induced 1,*N*²-Etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 601-609.
- LOUREIRO, A.P.M., DI MASCIO, P., MEDEIROS, M.H.G. (2002a) Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Química Nova* **25**, 777-793.
- LOUREIRO, A.P.M., MARQUES, S.A., GARCIA, C.C.M., DI MASCIO, P., MEDEIROS, M.H.G. (2002b) Development of an on-line liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry system to quantitatively determine 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **15**, 1302-1308.
- LOUREIRO, A.P.M., CAMPOS, I.P.A., GOMES, O.F., DI MASCIO, P., MEDEIROS, M.H.G. (2004) Structural characterization of diastereoisomeric ethano adducts derived from the reaction of 2'-deoxyguanosine with *trans, trans*-2,4-decadienal. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 641-649.
- LOWE, G.M., BOOTH, L.A., YOUNG, A.J., BILTON, R.F. (1999) Lycopene and β -carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. *Free Rad. Res.* **30**, 141-151.
- LOEWENSTEIN, W.R. (1979) Juncional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta* **560**, 1-65.
- LYKKESFELDT, J., VISCOVICH, M., POULSEN, H.E. (2003) Ascorbic acid recycling in human erythrocytes is induced by smoking in vivo. *Free Rad. Biol. Med.* **35**, (11), 1439-1447.
- MÄNNISTO, S., SMITH-WARNER, S.A., SPIEGELMAN, D., ALBANES, D., ANDERSON, K., van den BRANDT, P.A., CERHAN, J.R., CODITZ, G., FESKANICH, D., FREUNENHEIM, J.L., GIOVANNUCCI, E., GOLDBOHN, R.A., GRAHAM, S., MILLER, A.B., ROHAN, T.E., VIRTAMO, J., WILLETT, W.C., HUNTER, D.J. (2004) Dietary carotenoids and risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies. *Cancer. Epidem., Biom. Prev.* **13**, 40-48.
- MARNETT, L.J. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, **21**, (3), 361-370.
- MARNETT, L., PLASTARAS, J.P. (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *Trends in Genetics* **17**, (4), 215-221.
- MARTINEZ, G.R., MEDEIROS, M.H.G., Di MASCIO, P. Oxidation of 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine by singlet oxygen. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, resumos, 2002, p. 225.

- MARTINEZ, G.R., LOUREIRO, A.P.M., MARQUES, S.A., MIYAMOTO S., YAMAGUCHI, L.F., ONUKI J., ALMEIDA, E.A., GARCIA, C.C.M., BARBOSA, L.F., MEDEIROS, M.H.G., MASCIO, P.D. (2003) Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mut. Res.* **544**, 115-127.
- MATHEWS-ROTH, M.M. (1993) Carotenoids in erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **691**, 127-138.
- MATIJASEVIC, Z., SEKIGUCHI, M., LUDLUM, D.B. (1992) Release of *N*²,3-ethenoguanine from chloroacetaldehyde-treated DNA by Escherichia Coli 3-methyladenine DNA glycosylase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 9331-9334.
- MATOS, H.R., CAPELOZZI, V.L., GOMES, O.F., MASCIO, P.D., MEDEIROS, M.H. (2001) Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Arch. Biochem. Biophys.* **392**, (2), 171-177.
- MAYNE, S.T., PARKER, R.S. (1989) Antioxidant Activity of Dietary Canthaxanthin, *Nutr. Cancer* **12**, (3), 225-236.
- MAYNE, S.T. (1996) Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans, *The FASEB Journal* **10**, 690-701.
- MENISOGLU, A., SAMSON, L. (2000) Base-excision repair in yeast and mammals. *Mutation Res.* **451**, 39-51.
- MICHAELS, M.L., CRUZ, C., GROLLMAN, A.P., MILLER, J.H. (1992) Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7022-7025.
- MISIASZEK, R., UVAYDOV, Y., CREAN, C., GEACINTOV, N.E., SHAFIROVICH, V. (2004) Combination reactions of superoxide with 8-oxo-7,8-dihydroguanine radicals in DNA: kinetics and end products. *J. Biol. Chem. In press.*
- MOLLDREM, K.L., LI, J., SIMON, P.W., TANUMIHARDJO, S.A. (2004) Lutein and beta-carotene from lutein-containing yellow carrots are bioavailable in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, (1), 131-136.
- MOLLER, P., WALLIN, H. (1998) Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mutat. Res.* **410**, 271-2901.
- MORDI, R.C., WALTON, J.C., BURTON, G.W., HUGHES, L., INGOLD, K.U., LINDSAY, D.A., MOFFATT, D.J. (1993) Oxidative degradation of β -carotene and β -apo-8'-carotenal, *Tetrahedron* **49**, 911-928.

- MORINELLO, E.J., HAM, A.M, RANASINGHE, A., SANGAIAH, R., SWENBERG, J.A. (2001) Simultaneous quantitation of $N^2,3$ -ethenoguanine and $1,N^2$ -ethenoguanine with an Immunoaffinity/Gas Chromatography/High-Resolution Mass Spectrometry Assay. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 327-334.
- MORINELLO, E.J., KOC, H., RANASINGHE, A., SWENBERG, J.A. (2002) Differential induction of $N^2,3$ -ethenoguanine in rat brain and liver after exposure to vinyl chloride. *Cancer Research* **62**, (18), 5183-5188.
- MURATA, M.; KAWANISHI, S. (2000) Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *J. Biol. Chem.* **275**, (3), 2003-2008.
- MUSCAT, J.E., KLEINMAN, W., COLOSIMO, S., MUIR, A., LAZARUS, P., PARG, J., RICHIE, Jr., J.P. (2004) Enhanced protein glutathiolation and oxidative stress in cigarette smokers. *Free Rad. Biol. Med.* **36**, 4, 464-470.
- NADARAJAH, B., PARNAVELAS, J.G. (1999) Gap junction-mediated communication in the developing and adult cerebral cortex. *Novartis Found Symp.* **219**, 157-170; discussion 170-174.
- NAIR, V., OFFERMAN, R.J. (1985) Ring-extended products from the reaction of epoxy carbonyl compounds and nucleic acid bases. *J. Org. Chem.* **50**, 5627-5631.
- NAIR, J., BARBIN, A., GUICHARD, Y., BARTSCH, H. (1995) $1,N^6$ -ethenodeoxyadenosine and $3,N^4$ -ethenodeoxycytidine in liver DNA from humans and untreated rodents detected by immunoaffinity/ ^{32}P - postlabeling. *Carcinogenesis* **16**, 613-617.
- NAIR, J. (1999) Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in humans. In: Exocyclic DNA adducts in Mutagenesis and Carcinogenesis, B. Singer and H. Bartsch, eds. Lyon, France: IARC Sci. Publ. No. 150, pp 55-62.
- NAIR, J., BARBIN, A., VELIC, I., BARTSCH, H. (1999) Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat. Res.* **424**, 59-69.
- NAIR, J., FÜRSTENBERGER, G., BÜRGER, F., MARKS, F., BARTSCH, H. (2000) Promutagenic etheno-DNA adducts in mustistage mouse skin carcinogenesis: correlation with lipoxygenase-catalyzed arachidonic acid metabolism. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 703-709.
- NIKNAHAD, H., SIRAKI, A.G., SHUHENDLER, A., KHAN, S., TENG, S., GALAT, G., EASSON, E., POON, R., O' BRIEN, J. (2003) Modulating carbonyl cytotoxicity in intact rat hepatocytes by inhibiting carbonyl-metabolizing enzymes. I. Aliphatic alkenals. *Chemico-Biological Interaction* **143-144**, 107-117.

- NOWAK, R. (1994) Cancer prevention. Beta-carotene: helpful or harmful? *Science*, **22**, 264 (5158), 500-501.
- OBERMÜLLER-JEVIC, U.C., FRANZ, P.I., FRANK, J., FLACCUS, A., BIESALSKI, H.K. (1999) Enhancement of the UVA induction of haem oxygenase-1 expression by beta-carotene in human skin fibroblasts. *FEBS Letters* **460**, (2), 212-216.
- OBERMÜLLER-JEVIC, U.C., SCHLEGE, B., FLACCUS, A., BIESALSKI, H.K. (2001) The effect of β -carotene on the expression of interleukin-6 and heme oxygenase-1 in UV irradiated human skin fibroblasts in vitro. *FEBS Letters* **509**, 186-190.
- OMENN, G.S., GOODMAN, G.E., THORNQUIST, M.D., BALMES, J., CULLEN, M.R., GLASS, A., KEOGH, J.P., MEYSKENS, F.L., VALANIS, B., WILLIAMS, J.H., BARNHART, S., HAMMAR, S. (1996a) Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **334**, (18), 1150-1155.
- OMENN, G.S., GOODMAN, G.E., THORNQUIST, M.D., BALMES, J., CULLEN, M.R., GLASS, A., KEOGH, J.P., MEYSKENS, F.L., VALANIS, B., WILLIAMS, J.H., BARNHART, S., CHERNIACK, M.G., BRODKIN, C.A., HAMMAR, S. (1996b) Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, (21), 1550-1559.
- OLSON, J.A.; KRINSKY, N.I. (1995) Introduction: The colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. *The FASEB Journal* **9**, 1547-1550.
- PACHT, E.R., KASEKI, H., MOHAMMED, J.R., CORNWELL, D.G., DAVIS, W.B. (1986) Deficiency of vitamin E in the alveolar fluid of cigarette smokers: influence on alveolar macrophage cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* **77**, 789-796.
- PADULA, M., AMAYA, D.R. (1999) Degradação de β -caroteno e Cantaxantina em Sistema - Modelo de baixa umidade à temperatura ambiente. Formação de produtos não - voláteis e voláteis. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), UNICAMP.
- PAIVA, S.A.R., RUSSELL, R.M. (1999) β -carotene and other carotenoids as antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.*, **18**, (5), 426-433.
- PALEJWALA, V.A., RZEPKA, R.W., SIMHA, D., HUMAYUN, M.Z. (1993) Quantitative multilex sequence analysis of mutational hot spots. Frequency and specificity of mutation induced by a site specific ethenocytosine in M13 viral DNA. *Biochemistry* **32**, 4105-4111.

- PALOZZA, P., KRINSKY, N.J. (1992) Antioxidant effects of carotenoids *in vitro*: an overview. *Methods in Enzymology* **213** (38), Academic Press Inc.
- PALOZZA, P., CALVIELLO, G., BARTOLI, G.M. (1995) Prooxidant activity of β -carotene under 100% oxygen pressure in rat liver microsomes. *Free Rad. Biol. Med.* **19**, 887-892.
- PALOZZA, P., LUBERTO, C., CALVIELLO, G., RICCI, P., BARTOLI, G.M. (1997), Antioxidant and prooxidant role of beta-carotene in murine normal and tumor lymphocytes: Effects of oxygen partial pressure. *Free Rad. Biol. Med.* **22**, (6), 1065-1073.
- PALOZZA, P. (1998), Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. *Nutr. Rev.* **56**, (9), 257-265.
- PALOZZA, P., CALVIELLO, G., SERINI, S., MAGGIANO, N., LANZA, P., RANELLETTI, F.O., BARTOLI, G.M. (2001) β -carotene at high concentrations induces apoptosis by enhancing oxygen radical production in human adenocarcinoma cell. *Free Rad. Biol. Med.* **30**, 1000-1007.
- PALOZZA, P., SERINI, S., TORSELLO, A., BONINSEGNA, A., COVACCI, V., MAGGIANO, M., RANELLETTI, F.O., WOLF, F.I., CALVIELLO, G. (2002) Regulation of cell cycle progression and apoptosis by β -carotene in undifferentiated and differentiated HL-60 leukemia cells: possible involvement of a redox mechanism. *Int. J. Cancer* **97**, 593-600.
- PALOZZA, P., SERINI, S., TORSELLO, A., DI NICUOLO, F., PICCIONI, E., UBALDI, V., PIOLI, C., WOLF, F.I., CALVIELLO, G. (2003a) β -carotene regulates NF- κ B DNA-binding activity by a redox mechanism in human leukemia and colon adenocarcinoma cells. *J. Nutr.* **133**, 381-388.
- PALOZZA, P., SERINI, S., DI NICUOLO, F., PICCIONI, E., CALVIELLO, G. (2003b) Prooxidant effects of beta-carotene in cultured cells. *Mol. Aspects Med.* **24**, (6), 353-362.
- PALOZZA, P., SERINI, S., DI NICUOLO, F., BONINSEGNA, A., TORSELLO, A., MAGGIANO, N., RANELLETTI, F.O., WOLF, F.I., CALVIELLO, G., CITTADININ, A. (2004) β -Carotene exacerbates DNA oxidative damage and modifies p53-related pathways of cell proliferation and apoptosis in cultured cells exposed to tobacco smoke condensate. *Carcinogenesis* **25**, (8), 1315-1325.
- PANDYA, G.A., MORIYA, M. (1996) 1,*N*⁶-ethenodeoxyadenosine, a DNA adduct highly mutagenic in mammalian cells. *Biochemistry* **35**, 11487-11492.
- PAOLINI, M., CANTELLI-FORTI, G., PEROCCO, P., PEDULLI, G.F., ABDEL-RAHMAN, S.Z., LEGATOR, M.S. (1999) Co-carcinogenic effect of beta-carotene. *Nature* **398**, 760-761.

- PAOLINI, M., ANTELLI, A., POZZETTI, L., SPETLOVA, D., PEROCCO, P., VALGIMIGLI, L., PEDULLI, G.F., CANTELLI-FORTI, G. (2001) Induction of cytochrome P450 enzymes and over-generation of oxygen radicals in beta-carotene supplemented rats. *Carcinogenesis* **22**, (9) 1483-1495.
- PAOLINI, M., ABDEL-RAHMAN, S.Z., SAPONE, A., PEDULLI, G.F., PEROCCO, P., CANTELLI-FORTI, G., LEGATOR, M.S. (2003) β -Carotene: a cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? *Mutat. Res.* **543**, 195-200.
- PARK, E.M., PARK, Y.M., GWAK, Y.S. (1998) Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. *Free Rad. Biol. Med.* **25**, (1), 79-86.
- PARKER, R.S. (1996) Absorption, metabolism and transport of carotenoids. *FASEB J.* **10**, 542-551.
- PEROCCO, P., PAOLINI, M., MAZZULLO, M., BIAGI, G.L., CANTELLI-FORTI, G. (1999) Beta-carotene as an enhancer of cell transforming activity of powerful carcinogens and cigarette-smoke condensate on BALB/c 3T3 cells in vitro. *Mutat. Res.* **440**, 83-90.
- PETO, R., DOLL, R., BUCKLEY, J.D., SPORN, M.B. (1981) Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* **290**, 201-208.
- POIRIER, M.C., SANTELLA, R.M., WESTON, A. (2000) Carcinogen macromolecular adducts and their measurement. *Carcinogenesis* **21**, (3), 359-359.
- POLLACK, M., OE, T., LEE, S.H., ELIPE, M.V.S., ARISON, B.H., BLAIR, I.A. (2003) Characterization of 2'-deoxycytidine adducts derived from 4-oxo-2-nonenal, a novel lipid peroxidation product *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 893-900.
- POOL-ZOBEL, B.L., BUB, A., MULLER, H., WOLLOWSKI, I., RECHKEMMER, G. (1997) Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis* **18**, 1847-1850.
- PRYOR, W.A., STONE, K. (1993) Oxidants in cigarette smoke. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **686**, 12-28.
- PRYOR, W.A., STONE, K., ZANG, L.-Y., BERMÚDEZ, E. (1998) Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 441-448.
- QIU, Y., ZHU, J., BANDI, V., ATMAR, R.L., HATTOTUWA, K., GUNTUPALLI, K.K. (2003) Biopsy neutrophilia, neutrophil chemokine, and receptor gene expression in severe exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **168**, 968-975.

- RAHMAN, I., MacNEE, W. (1996) Role of oxidants/antioxidants in smoking induced lung diseases. *Free Rad. Biol. Med.* **21**, 669-681.
- RAO, A.V., AGARWAL, S. (2000) Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J. Am. Coll. Nutr.* **19**, 563-569.
- RAVANAT, J.-L., DI MASCIO, P., MARTINEZ, G.R., MEDEIROS, M.H.G., CADET, J. (2000) Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *J. Biol. Chem.* **275**, 40601-40604.
- RAVANAT, J.-L., SAINT-PIERRE, C., CADET, J. (2003) One-electron oxidation of the guanine moiety of 2'-deoxyguanosine: influence of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 2030-2031.
- REDDY, S., FINKELSTEIN, E.I., WONG, P.S.Y., PHUNG, A., CROSS, C.E., van der VLIET, A. (2002) Identification of glutathione modifications by cigarette smoke. *Free Rad. Biol. Med.* **33**, (11), 1490-1498.
- RICE-EVANS, C. A., SAMPSON, J.; BRAMLEY, P.M., HOLLOWAY, D.E. (1997) Why do we expect carotenoids to be antioxidants *in vivo*? *Free Rad. Res.* **26**, 381-398.
- RICHMAN, P.G., MEISTER, A. (1975) Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by non-allosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* **250**, 1422-1426.
- RINDGEN, D., NAKAJIMA, M., WEHRLI, S., XU, K., BLAIR, I.A., (1999) Covalent modifications to 2'-deoxyguanosine by 4-oxo-2-nonenal, a novel product of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 1195-1204.
- RISO, P., PINDER, A., SANTANGELO, A., PORRINI, M. (1999), Does tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage? *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, 712-718.
- RISO, P., BRUSAMOLINO, A., SCALFI, L., PORRINI, M. (2004) Bioavailability of carotenoids from spinach and tomatoes. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **14**, (3), 150-156.
- ROBERTS, D.W., CHURCHWELL, M.I., BELAND, F.A., FANG, J.-L., DOERGE, D.R. (2001) Quantitative analysis of etheno-2'-deoxycytidine DNA adducts using on-line immunoaffinity chromatography coupled with LC/ES-MS/MS detection. *Anal. Chem.* **73**, 303-309.
- ROSSEAU, E.J., DAVISON, A. J., DUNN, B. (1992) Protection by β -carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis, *Free Rad. Biol. Med.* **13**, 407-433.

- SALGO, M.G., CUETO, R., WINSTON, G.W., PRYOR, W.A. (1999) Beta carotene and its oxidation products have different effects on microsome mediated binding of benzo[A]pyrene to DNA. *Free Rad. Biol. Med.* **26**, 162-173.
- SAPARBAEV, M., KLEIBL, K., LAVAL, J.(1995) *Escherichia Coli*, *Saccharomyces Cerevisiae*, rat and human 3-methyladenine DNA glycosylases repair 1,N⁶-ethenoadenine when present in DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3750-3755.
- SAPARBAEV, M., LAVAL, J.(1998) 3,N⁴-ethenocytosine, a highly mutagenic adduct is a primary substrate for *Escherichia Coli* double-stranded uracil-DNA glycosylase and human mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 8508-8513.
- SAPARBAEV, M., LANGOUËT, S., PRIVEZENTZEV, C.V., GUENGERICH, F.P., CAI, H., ELDER, R.H., LAVAL, J. (2002) 1,N²-ethenoguanine, a mutagenic DNA adduct, is a primary substrate of *Escherichia coli* mismatch-specific uracil-DNA glycosylase and human alkylpurine-DNA-N-glycosylase. *J. Biol. Chem.* **30**, 26987-26993.
- SATTANGI, P.D., LEONAR, N.J., FRIHART, C.R. (1977) 1,N²-ethenoguanine and 1,N²,3-ethenoguanine. Synthesis and comparison of the electronic spectral properties of these linear and angular triheterocycles related to the Y bases. *J. Org. Chem.* **42**, 20, 3292-3296.
- SEDJO, R.L., PAPENFUSS, M.R., CRAFT, N.E., GIULIANO, A.R. (2003) Effect of plasma micronutrients on clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection (United States). *Cancer Causes Control* **14**, (4), 319-326.
- SEGERBACK, D. (1983) Alkylation of DNA and hemoglobin in the mouse following exposure to ethene and ethane oxide. *Chem. Biol. Interact.* **45**, (2), 139-151.
- SEVERS, N.J. (1999) Cardiovascular disease. *Novartis Found Symp.* **219**, 188-206, discussion: 206-211.
- SHAISH, A., DAUGHERTY, A.F.O.S., SCHONFELD, G., HEINECKE, J.W. (1995), beta-carotene inhibits atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *J. Clin. Invest.* **96**, 2075-2082.
- SHARONI, Y., DANILENKO, M., DUBI, N., BEN-DOR, A., LEVY, J. (2004) Carotenoids and transcription. *Arch. Biochem. Biophys.* **430**, 89-96.
- SHUKER, D.E. (2002) The enemy at the gates? DNA adducts as biomarkers of exposure to exogenous and endogenous genotoxic agents. *Toxicol. Lett.* **134**, (1-3), 51-56.
- SIES, H. (1991) Oxidative Stress II. Oxidants and Antioxidants. Academic Press, London.

- SIES H. AND STAHL, W. (1995) Vitamins E and C, α -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 1315S-1321S.
- SIMON, A.M., GOODENOUGH, D.A. (1998) Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell. Biol.* **8**, (12), 477-483.
- SINGER, B., SPENGLER, S.J., CHAVEZ, F., KU'SMIEREK, J.T. (1987) The vinyl chloride-derived nucleoside, $N^2,3$ -ethenoguanosine, is a highly efficient mutagen in transcription. *Carcinogenesis* **8**, (5), 745-747.
- SODUM, R.S., CHUNG, F.-L. (1988) $1,N^2$ -ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by trans-4-hydroxy-2-nonenal. *Cancer Res.* **48**, 320-323.
- SODUM, R.S. CHUNG, F.-L. (1989) Structural characterization of adducts formed in the reaction of 2,3- epoxy-4-hydroxynonanal with deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol.* **2**, 23-28.
- SODUM, R.S., CHUNG, F.-L. (1991) Stereoselective formation of in vitro nucleic acid adducts by 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal. *Cancer Res.* **51**, 137-143.
- SPASSKY, A., AND ANGELOV, D. (1997) Influence of the local helical conformation on the guanine modifications generated from one-electron DNA oxidation. *Biochemistry* **36**, 6571-6576.
- SPITZ, D.R., SULLIVAN, S.J., MALCOLM, R.R., ROBERTS, R.M.L (1991) Glutathione dependent metabolism and detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Rad. Biol. Med.* **11**, 415-423.
- SPRAY, D.C., WHITE, R.L., MAZET, F., BENNETT, M.V. (1985) Regulation of gap junctional conductance. *Am. J. Physiol.* **248**, H753-764.
- STAHL, W., SCHWARTZ, W., SUNDQUIST, A.R., SIES, H. (1992) cis-trans isomers of lycopene and beta-carotene in human serum and tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, (1), 173-177.
- STAHL, W., NICOLAI, S., HANUSCH, M., SIES, H. (1994) Vitamin D influences gap junctional communication in C3H/10T 1/2 murine fibroblast cells. *FEBS Lett.* **352**, (1), 1-3.
- STAHL, W., SIES, H. (1996) Lycopene: A biologically important carotenoid for humans? *Arch. Biochem. Biophys.* **336**, 1-9.
- STAHL, W., VON LAAR, J., MARTIN, H.D., EMMERICH, T., SIES, H. (2000) Stimulation of gap junctional communication: comparison of acyclo-retinoic acid and lycopene. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, (1):271-274.

- STRATTON, S.P., SCHAEFER, W.H., LIEBLER, D.C. (1993) Isolation and Identification of singlet oxygen oxidation products of β -carotene. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 542-547.
- STINGER, K.A., FREED, B.M., DUNN, J.S., SAYERS, S., GUSTAFSON, D., L., FLORES, S.C. (2004) Particulate phase cigarette smoke increases MnSOD, NQO1, and CINC-1, in rat lungs. *Free Radical Biol. Med.* **37**, (10), 1527-12533.
- SUGANUMA, H., INAKUMA, T. (1999) Protective effect of dietary tomato against endothelial dysfunction in hypercholesterolemic mice. *Biosci. Biotech. Biochem.* **63**, 78-82.
- SWENBERG, J. A., FEDTKE, N., CIROUSSEL, F., BARBIN, A. E BARTSCH, H. (1992) Etheno adducts formed in DNA of vinyl chloride-exposed rats are highly persistent in liver. *Carcinogenesis* **13**, 727-729.
- TAPIERO, H., TOWNSEND, D.M., TEW, K.D. (2004) The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **58**, 100-110.
- TEICHER, V.B., KUCHARSKI, N., MARTIN, H-D., van der SAAG, P., SIES, H., STAHL, W. (1999) Biological activities of apo-canthalaxanthinoic acids related to gap junctional communication, *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 150-155.
- TERAO, J. (1989) Antioxidant activity of beta-carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*, **24** (7), 659-61.
- TERAO, J., BANDO, N., HAYASHI, H., YAMAUCHITA, R. (2001) Protective effect of β -carotene on UVA and visible light-induced photooxidation of mouse skin in ex vivo system. *Abstr. Pap. – Am. Chem. Soc.*, 221 st.
- TREBER, M.G. (2004) The ABCs of vitamin E and beta-carotene absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* **82**, (1), 3-4.
- TROSKO, J.E., RUCH, R.J. (1998) Cell-cell communication in carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience* **3**, 208-236.
- TROSKO, J.E., CHANG, C.C. (2001) Mechanism of up-regulated gap junctional intercellular communication during chemoprevention and chemotherapy of cancer. *Mutat. Res.* **480/481**, 219-229.
- TRUSCOTT, T.G. (1996) β -Carotene and disease: a suggested pro-oxidant and anti-oxidant mechanism and speculations concerning its role in cigarette smoking, *J. Photochem. Photobiol.* **35**, 233-235.

- UCHIDA, K., SHIRAIISHI, M., NAITO, Y., TORII, Y., NAKAMURA, Y., OSAWA, T. (1999) Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hidroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J. Biol. Chem.* **274**, 2234-2242.
- van den BERG, H., FAUKS, R., GRANADO, H.F., HIRSCHBERG J. OLMEDILLA, B., SANDMANN, G., SOUTHON, S. AND STAHL, W. (2000) The potencial for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects, *J. Sci. Food. Agric.* **80**, 880-912.
- van POPPEL G., POULSEN, H., LOFT, S., VERHAGEN, H. (1995) No influence of beta-carotene on oxidative DNA damage in male smokers. *J. Natl Cancer Inst.* **87**, (4), 310-311.
- VANEY, D.I. (1999) Neuronal coupling in the central nervous system: lessons from the retina. *Novartis Found Symp.* **219**, 113-125.
- WANG, X.-D., TANG, G.-W., FOX, J.G., KRINSKY, N.I., RUSSELL, R.M. (1991) Enzymatic conversion of β -carotene into β -apo-carotenals and retinoids by human, monkey, ferret and rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **285**, 8-16.
- WANG, L., HIRAYASU, K., ISHIZAWA, M., KOBAYASHI, Y.. (1994) Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acids Res.* **22**, (9), 1774-1775.
- WANG, X-D., RUSSELL, R.M., LIU, C., STICKEL, F., SMITH, D.E., KRINSKY, N.I. (1996) β -oxidation in rabbit liver in vitro and in the perfused ferret liver contributes to retinoic acid biosynthesis from β -apocarotenoic acids. *J. Biol. Chem.* **271**, 26490-26498.
- WANG, X.D., RUSSELL, R.M. (1999), Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of β -carotene. *Nutr. Rev.* **57** (9), 263-272.
- WANG, S.D., LIU, C., BRONSON, R.T., SMITH, D.E., KRINSKY, N.I., RUSSELL, R.M. (1999) Retinoid Signaling and activator protein-1 expression in ferrets given β -carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J. Natl. Cancer. Inst.* **91**, (1), 60-66.
- WISEMAN, H., HALLIWELL, B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* **313**, 17-29.
- WOLF, G. (2002) The effect of low and high doses of beta-carotene and exposure to cigarette smoke on the lungs of ferrets. *Nutr. Rev.* **60**, (3), 88-90.
- WONG, H.L., MURPHY, S.E., HECHT, S.S. (2003) Preferential metabolic activation of *N*-nitrosopiperidine as compared to its structural homologue *N*-nitrosopyrrolidine by rat nasal mucosal microsomes. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 1298-305.

- WOODS, J.A., YOUNG, A.J., BILTON, R.F. (1999) Carotene enhances hydrogen peroxide-induced DNA damage in human hepatocellular HepG2 cell. *FEBS Lett.* **449**, 255-258.
- WURZEL, H., YEH, C.C., GAIROLA, C., CHOW, C.K. (1995) Oxidative damage and antioxidant status in the lungs and bronchoalveolar lavage fluid of rats exposed chronically to cigarette-smoke. *J. Biochem. Toxicol.* **10**, (1), 11-17.
- YAMASAKI, H., MESNIL, M. OMORI, Y., MIRONOV, N., KRUTOVSKIKH, V. (1995) Intercellular communication and cancerogenesis. *Mutat. Res.* **333**, 181-188.
- YANG, Y, NAIR, J., BARBIN, A., BARTSCH, H. (2000) Immunohistochemical detection of 1,N⁶-ethenodeoxyadenosine, a promutagenic DNA adduct, in liver of rats exposed to vinyl chloride or an iron overload. *Carcinogenesis* **21**, 777- 778.
- YEH, S.L., HU, M.L. (2000) Antioxidant and pro-oxidant effects of lycopene in comparison with β -carotene on oxidant-induced damage in Hs68 cells. *J. Nur. Biochem.* **11**, 548-554.
- YEH, S.L., HU, M.L. (2001) Induction of oxidative DNA damage in human foreskin fibroblast Hs68 cells by oxidized beta-carotene and lycopene. *Free Rad. Res.* **35**, (2), 203-231.
- YEH, S.L., YANG, T.H., HUANG, C.H., HU, M.L. (2003) Exposure of calf thymus DNA to autoxidized β -carotene results in the formation of 8-oxo-deoxyguanosine. *Food Chemistry* **81**, 439-445.
- YEN, T.Y., HOLT, S., SANGAIAH, R., GOLD, A. SWENBERG, J.A. (1998) Quantitation of 1,N⁶-ethenoadenine in rat urine by immunoaffinity extraction combined with liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 810-815.
- YOUNG, A.J., LOWE, G.M. (2001) Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **385**, (1), 20-27.
- ZANG, L.Y., STONE, K., PRYOR, W.A. (1995) Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance. *Free Rad. Biol. Med.* **19**, 161-167.
- ZELKO, L.N., MARIANI, T.J., FOLZ, R.J. (2002) Superoxide dismutase mutigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free Rad. Biol. Med.* **33**, 337-349.
- ZHANG, L-X., COONEY, R.V., BERTRAM, J.S. (1991) Carotenoids enhance gap-junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis* **12**, 2109-2114.

ZHANG, L-X., COONEY, R.V., BERTRAM, J.S. (1992) Carotenoids up-regulate connexin43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res.* **52**, 5707-5712.

ZHANG, P., OMAYE, S.T. (2001) DNA strand breakage and oxygen tension: effects of β -carotene, α -tocopherol and ascorbic acid. *Food Chem. Toxicol.* **39**, 239-246.