NATÁLIA BEATRIZ RIGOLDI COLOMBO

**Ação dos compostos antioxidantes na redução do estresse
oxidativo em modelo experimental de câncer de pulmão:
estudo do pequi (*Caryocar brasiliense camb*)**

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências**

**Programa de: Fisiopatologia
experimental**

**Orientador: Prof^a Dra. Vera Luiza
Capelozzi**

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Colombo, Natália Beatriz Rigoldi

Ação dos compostos antioxidantes na redução do estresse oxidativo em modelo experimental de câncer de pulmão : estudo do pequi (*Caryocar brasiliense camb*) / Natália Beatriz Rigoldi Colombo. -- São Paulo, 2013.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Vera Luiza Capelozzi.

Descritores: 1.Pequi 2.Neoplasias pulmonares 3.Dano ao DNA 4.Peroxidação de lipídeos 5.Modelos animais 6.Antioxidantes 7.Estresse oxidativo 8.Óleos vegetais 9.Extratos vegetais 10.Frutas

USP/FM/DBD-457/13

Dedico este trabalho a minha família, sem seu apoio
nada disso teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desta dissertação foi uma experiência maravilhosa, pois através dela adquiri novos conhecimentos e enxerguei novos caminhos, e tive a oportunidade de conhecer pessoas incríveis que me ajudaram e me apoiaram em todos os momentos, e me serviram de exemplo durante toda essa caminhada.

Agradeço aos meus pais, que são meu exemplo de força, vontade, dedicação e persistência. Por estarem sempre ao meu lado me orientando e me apoiando. Foi tudo muito mais fácil podendo contar com vocês durante todo esse processo.

Agradeço ao meu marido pelo companheirismo e por ter estado sempre ao meu lado em todos os momentos que se passaram durante essa fase, momentos de alegria, momentos de mau humor, momentos de ansiedade que estão sendo todos recompensados. Não teria conseguido sem você.

Agradeço ao meu irmão pela amizade, pelas palavras de incentivo e por ter acreditado em mim quando eu mesma não acreditei. Você tem grande participação nessa minha conquista.

À Prof^a Vera Capelozzi por ser uma pessoa maravilhosa e profissional excepcional, que me deu essa oportunidade incrível e esteve sempre disposta a me ajudar e me ensinar. Ainda tenho muito o que aprender com você. Você é um grande exemplo de dedicação, persistência e humildade!

Ao Edwin Parra, amigo e “co-orientador” de coração. Seu apoio foi fundamental para que eu chegasse até aqui, pela sua paciência gigantesca de

me ensinar desde a coisa mais básica até a como segurar um camundongo, por me acalmar nos momentos de crise sempre dizendo que tudo no fim da certo. Devo muito a você.

Á Maristela Rangel, por toda a sua ajuda e paciência, por estar sempre disposta a ajudar e ensinar. Pela amizade, risadas, distrações e pelos ótimos momentos. É muito bom saber que posso contar sempre com você.

Á Vanessa Martins, que me surpreendeu com seu jeito carismático e pela sua amizade. E por estar sempre disposta a me ajudar.

Á Marcelo Antunes, pelas risadas no laboratório e por ter se tornado um bom amigo.

Á Jymenez de Moraes, por ter me proporcionado essa oportunidade, me apresentando a essas pessoas maravilhosas e por ter me mostrado um novo caminho.

Á Priscila Cristina Andrade, pelo companheirismo e amizade. Pela parceria até nas madrugadas de experimentos e também pelas palavras de incentivo. Tudo fica muito mais fácil sabendo que posso contar com pessoas como vocês.

Ao meu primo, Leonardo Bonjardim, pelas orientações, direcionamentos e por ser sempre tão prestativo sempre que precisei. Admiro muito você.

Ao Dr. Cesar Koppe Grisolia, por ter confiado no nosso trabalho e nos cedido o extrato e o óleo de pequi, resultado de um sério e dedicado trabalho. Obrigada! Sem a sua ajuda esse projeto não teria sido possível.

Ao Prof. Dr. Daniel Pens Gelain, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), por ter aberto as portas do seu laboratório de Estresse Oxidativo e me permitido aprender e ampliar o meu conhecimento a respeito do assunto. Admiro muito a sua competência. Aos amigos da UFRGS, Carlos Schnorr e Eduardo Kolling, pelo empenho e pela dedicação em me ajudar e a me ensinar. Aprendi muito com vocês.

À Márcia Hage, por toda a paciência e empenho em me orientar com as técnicas do teste do Cometa. Foi uma experiência árdua e muito gratificante.

À Denise e Hermes Barbeiro, por me auxiliarem com as técnicas utilizadas nesse projeto.

À FAPESP pelo suporte financeiro de toda pesquisa.

*“Nutra a sua mente com grandes pensamentos, pois você nunca irá mais alto
do que o que pensa”*
Benjamin Disraeli

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de biblioteca e documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de biblioteca e documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Resumo

Summary

Índice

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Câncer.....	01
1.2 Câncer de pulmão	02
1.3 Causas principais e fatores de risco para o câncer de pulmão.....	03
1.4 Modelos Experimentais de Câncer de Pulmão.....	04
1.5 Espécies Reativas e Radicais Livres sobre as funções corporais.....	06
1.6 Espécies Reativas de oxigênio (EROs)	09
1.7 Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN).....	09
1.8 Estresse Oxidativo e Carcinogêse.....	11
1.9 Defesa Antioxidante.....	14
1.10 Defesa Antioxidante Endógena.....	15
1.11 Defesa Antioxidante Exógena.....	17
1.12 O Pequi (<i>Caryocar brasiliense camb</i>) como Antioxidante.....	21
2. HIPÓTESE	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivos Gerais.....	27

4. MÉTODOS.....	29
4.1 <i>Desenho Experimental.....</i>	29
4.1.1 <i>Animais Utilizados.....</i>	29
4.1.2 <i>Indução da Carcinogênese Pulmonar</i>	30
4.1.3 <i>Compostos Utilizados na Gavagem.....</i>	30
4.1.4 <i>Grupos e Gavagem.....</i>	30
4.1.5 <i>Eutanásia.....</i>	32
4.2 <i>Determinação da atividade antioxidante enzimática em tecido pulmonar.....</i>	33
4.2.1 <i>Catalase em placa (CAT).....</i>	33
4.2.2 <i>Superóxido Dismutase (SOD).....</i>	34
4.2.3 <i>Glutathione Peroxidase (GPx) em placa</i>	36
4.2.4 <i>Relação Superóxido Dismutase e Catalase (SOD/CAT).....</i>	37
4.3 <i>Técnica utilizada para avaliar o dano oxidativo em DNA (Teste do Cometa).....</i>	37
4.4 <i>Técnica utilizada para avaliar a peroxidação lipídica no tecido pulmonar - Teste de TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances).....</i>	39
4.5 <i>Biologia Molecular para análise da expressão gênica das enzimas óxido nítrico sintetases NOS1, NOS2 e NOS 3.....</i>	41
4.5.1 <i>Extração de RNA</i>	41
4.5.2 <i>Reação da Transcrição Reversa (RT-PCR) para obtenção do cDNA.....</i>	42
4.5.3 <i>Reação em cadeia de polimerização em tempo real.....</i>	42

4.6 Técnica imunohistoquímica para avaliar a expressão dos antígenos NOS1, NOS2 e NOS3 em células alveolares e bronquiolares.....	43
4.7 Histomorfometria.....	45
4.8 Tabulação dos dados e análise estatística.....	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1 Modelo Experimental de Carcinogênese.....	48
5.2 Atividade Enzimática Antioxidante.....	49
5.2.1 Atividade enzima antioxidante nos grupos uretana e suplementados.	51
5.3 Dano oxidativo no DNA.....	55
5.3.1 Dano Oxidativo no DNA dos animais iniciados e suplementados.....	58
5.4 Avaliação da peroxidação lipídica.....	61
5.4.1 Avaliação da Peroxidação Lipídica dos Animais Iniciados e Suplementados.....	62
5.5 Expressão gênica das enzimas óxido nítrico sintetase NOS 1, NOS 2 e NOS 3 no tecido pulmonar.....	64
5.5.1. Expressão gênica das NOS1, 2 e 3 nos grupos Controle e Iniciados.....	64
5.6 Imunoexpressão das enzimas óxido nítrico sintetase NOS 1, NOS 2 e NOS 3 no tecido pulmonar	69
5.6.1 Imunoexpressão das NOS1, 2 e 3 nos grupos Controle e Iniciado.....	69
5.6.2 Imunoexpressão das NOS1, 2 e 3 nos Grupos Iniciados e Suplementados.....	71

6. DISCUSSÃO.....	78
7. CONCLUSÃO.....	83
8. ANEXOS.....	84
<i>Anexo 1. Tabulação dos Dados obtidos.....</i>	<i>84</i>
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
<i>Apêndices</i>	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>As fases do desenvolvimento da carcinogênese.....</i>	11
Figura 2. <i>O pequizeiro.....</i>	22
Figura 3. <i>O fruto pequi</i>	22
Figura 4. <i>Camundongos Balb/C.....</i>	29
Figura5. <i>Gavagem.....</i>	32
Figura6. <i>Células cometa.....</i>	39
Figura7. <i>Aferição das medidas de cabeça e cauda dos cometas.....</i>	47
Figura 8. <i>Iniciação neoplásica induzida pela uretana.....</i>	49
Figura 9. <i>Pulmões controles e iniciados expressam atividades diferentes da atividade enzimática antioxidante.....</i>	50
Figura 10. <i>Pulmões iniciados e suplementados expressam atividade semelhante da enzima antioxidante catalase.....</i>	52
Figura 11. <i>Pulmões iniciados e suplementados expressam atividade semelhante da enzima antioxidante superóxido dismutase.....</i>	53
Figura 12. <i>Pulmões iniciados e suplementados expressam relações diferentes entre a atividade da enzima superóxido dismutase e catalase.....</i>	54
Figura 13. <i>Pulmões iniciados e suplementados expressam atividade semelhante da enzima antioxidante glutathiona peroxidase.</i>	55
Figura 14. <i>Pulmões controles e iniciados com uretana expressam diferentes graus de dano oxidativo no DNA.....</i>	56
Figura 15. <i>Células cometa no grupo controle e iniciado com uretana.....</i>	57
Figura 16. <i>Pulmões iniciados e suplementados expressam diferentes graus de dano oxidativo no DNA.....</i>	59

Figura 17. <i>Dano em DNA no tecido pulmonar dos camundongos iniciados com uretana e suplementados</i>	60
Figura 18. <i>Pulmões controles e iniciados expressam diferentes graus de peroxidação lipídica</i>	62
Figura 19. <i>Pulmões iniciados e suplementados expressam diferentes graus de peroxidação lipídica</i>	63
Figura 20. <i>Figura 20. Pulmões controles e iniciados apresentam diferente expressão gênica das isoformas da NOS</i>	65
Figura 21. <i>Expressão gênica da NOS1 nos pulmões iniciados e suplementados</i>	67
Figura 22. <i>Animais iniciados e suplementados apresentam diferente expressão gênica da NOS2</i>	67
Figura 23. <i>Animais iniciados e suplementados apresentam diferente expressão gênica da NOS3</i>	68
Figura 24. <i>Pulmões controles (C) e uretana (U) expressam frações diferentes de isoformas das NOS</i>	70
Figura 25. <i>Pulmões iniciados com uretana e suplementados imunoexpressam frações diferentes de isoformas das NOS 1</i>	72
Figura 26. <i>Pulmões iniciados e suplementados imunoexpressam frações diferentes de isoformas das NOS 2</i>	73
Figura 27. <i>Pulmões iniciados e suplementados imunoexpressam frações diferentes de isoformas das NOS 3</i>	74
Figura 28. <i>Marcações imunohistoquímicas para NOS 1; NOS 2 e NOS 3</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Composição Percentual de ácidos graxos da polpa do pequi.....</i>	24
Tabela 2. <i>Composição de carotenóides na polpa do pequi.....</i>	25
Tabela 3. <i>Ácidos fenólicos identificados na polpa do pequi.....</i>	25
Tabela 4. <i>Atividade das enzimas antioxidantes observadas no tecido pulmonar dos animais controles e dos iniciados</i>	50
Tabela 5. <i>Atividade das enzimas antioxidantes observadas no tecido pulmonar dos animais iniciados e suplementados.....</i>	51
Tabela 6. <i>Grau de dano em DNA verificado nas células respiratórias pelo teste do cometa.....</i>	56
Tabela 7. <i>Média e DP da relação cauda/cabeça nas células pulmonares dos animais iniciados e suplementados.....</i>	58
Tabela 8. <i>Níveis de peroxidação lipídica observadas no tecido pulmonar dos animais controles e dos iniciados.....</i>	61
Tabela 9. <i>Pulmões controles e iniciados expressam diferentes graus de peroxidação lipídica.....</i>	63
Tabela 10. <i>Quantificação relativa da expressão gênica observada no tecido pulmonar dos animais controles e dos iniciados.....</i>	64
Tabela 11. <i>Média e DP da quantificação relativa da expressão gênica das óxido nítrico sintases observada no tecido pulmonar dos animais iniciados e suplementados.....</i>	66
Tabela 12. <i>Porcentagem de área ocupada pelas células alveolares septais com imunoexpressão de NOS nos pulmões de animais controles e uretana.....</i>	69

<i>Tabela 13. Fração de área ocupada pelas células alveolares septais com imunoexpressão de NOS nos pulmões de animais com uretana e suplementados.....</i>	<i>71</i>
--	------------------

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ca – Câncer

et al. – e outros

OMS/WHO – Organização Mundial da Saúde/ World Health Organization

CP – Câncer de Pulmão

ER – Espécies Reativas

RL – Radicais Livres

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

O₂^{•-} - Superóxido

ONOO⁻ - peroxinitrito

DNA – ácido desoxirribonucléico

RNA – ácido ribonucléico

MDA – malonaldeído

Fe⁺ - ferro

Cu⁺ -Cobre

O₂ - oxigênio

HO[•] - Radical Hidroxila

ROO[•] - Radical Peroxila

RO[•] - Radical alcóxila

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

NO[•] - Óxido Nítrico

NOS1 – óxido nítrico sintase neuronal

NOS 2 – óxido nítrico sintase endotelial

NOS 3 – óxido nítrico sintase indutível

SOD – Enzima superóxido Dismutase

CAT – Catalase

GPx – Glutathione Peroxidase

SOD/CAT – Relação SOD/CAT

H – Hidrogênio

GSH – Glutathione

GSSG – Glutathiona Dissulfeto Oxidada

mg – miligrama

μL – microlitros

ptn - proteína

RESUMO

Colombo NBR. *Ação dos compostos antioxidantes na redução do estresse oxidativo em um modelo experimental de câncer de pulmão: estudo do pequi (caryocar brasiliense camb)*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução. Uma alimentação rica em antioxidantes pode prevenir e reparar danos oxidativos causados pelas espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, como o dano no DNA e a peroxidação lipídica e pode reduzir o risco de câncer, aterosclerose e outras doenças degenerativas. A polpa do Caryocar Brasiliense Camb, mais conhecido como pequi, é uma fruta do cerrado brasileiro que possui altos níveis de antioxidantes como os carotenóides, vitamina C e E e compostos fenólicos. **Objetivos.** Verificar a atividade antioxidante do óleo e do extrato da polpa do pequi na diminuição do estresse oxidativo em um modelo experimental de carcinogênese pulmonar. **Métodos.** O estudo foi realizado em 40 camundongos BALB/C machos: 35 animais foram submetidos a duas doses intra-peritoniais de 1,5 g/kg de uretana (U = 5), 10 destes camundongos receberam por gavagem 15µL de óleo da polpa do pequi (UO = 10), 10 animais receberam gavagem de 15µL de extrato etanólico de polpa de pequi (UE = 10) e os 10 animais restantes receberam por gavagem 3µg/kg de betacaroteno (UB = 10). 5 camundongos não receberam as doses de uretana nem a gavagem (C = 5). Após 60 dias, os grupos foram sacrificados. A defesa antioxidante enzimática foi mensurada pelo teste bioquímico. A atividade antioxidante do óleo de pequi foi avaliada nos tecidos do pulmão pelo teste bioquímico de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e os danos do DNA pelo método de teste de cometa. A expressão gênica e protéica das óxido nítrico sintases foi analisada por biologia

molecular e imunohistoquímica, respectivamente. **Resultados.** O parênquima pulmonar dos animais que receberam as doses de uretana apresentaram formações neoplásicas induzidas pela carcinogênese química, em contraste com o grupo Controle. Os grupos de animais que receberam as doses de uretana e foram suplementados com o betacaroteno, o óleo e o extrato de pequi apresentaram resultados importantes na diminuição do dano no DNA, na peroxidação lipídica e na expressão protéica e gênica das isoformas da óxido nítrico sintase (NOS1, NOS2 e NOS3) ao contrário dos animais que receberam apenas as doses de uretana. **Conclusão.** Concluiu-se que os diferentes compostos antioxidantes encontrados no óleo e no extrato do pequi são eficientes para diminuir a expressão das enzimas óxido nítrico sintase, o dano no DNA e a peroxidação lipídica em um modelo experimental de carcinogênese pulmonar induzida pelo uretana, sugerindo que essa fruta possa contribuir no tratamento de câncer de pulmão.

Descritores. Câncer do pulmão, pequi, *caryocar brasiliense camb*, estresse oxidativo, antioxidantes, dano no DNA, peroxidação lipídica.

ABSTRACT

Colombo NBR. *The action of the antioxidant compounds in the reduction of the oxidative stress in an experimental model of lung cancer: the study of the pequi (Caryocar brasiliense camb)*. [dissertation]. "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Introduction. A daily consumption of foods that are rich in antioxidant compounds can prevent and repair the oxidative damage caused by reactive species of oxygen and nitrogen, such as DNA damage and lipid peroxidation and can reduce the risk of cancer, atherosclerosis and other degenerative diseases. The pulp of the *Caryocar brasiliense camb*, most known as pequi, has high levels of antioxidant compounds such as carotenoids, phenolic compounds and vitamin C and E. **Objectives.** Verify the antioxidant activity of the oil and extract of the pequi pulp in diminishing of the oxidative stress in an experimental model of lung cancer. **Methods.** The study was performed in 40 male BALB/c mice: 35 animals were submitted to two doses of 1,5g/kg intraperitoneal of urethane (U=5), 10 of these mice received by gavage 15µL of pequi pulp oil (UO=10), 10 animals received by gavage 15µL of ethanolic extract of pequi pulp (UE=10) and the other 10 animals received by gavage 3µg/kg of betacarotene (UB=10). 5 mice didn't receive the urethane doses neither the gavage (C=5). After 60 days, the groups were sacrificed. The enzymatic antioxidant defense was measured by biochemical test. The antioxidant activity of pequi oil was evaluated in the lung tissues by the biochemical TBARS test (*Thiobarbituric acid-reactive substances*) and the DNA damage by the comet test method. Nitric oxid Synthases gene and protein expression was analyzed by molecular biology and imunohistochemistry, respectively. **Results.** The pulmonary parenquima of animals that received the urethane doses showed neoplastic

formations induced by the chemical carcinogenesis, in contrast with the control group. The groups of animals that received the urethane doses and the treatment with the oil, extract and betacarotene showed an important result in diminishing the DNA damage, lipid peroxidation, genic and protein expression of the nitric oxid synthase isoforms (NOS1,NOS2,NOS3), different from what we found in the group that just received the urethane doses. **Conclusion.** The different antioxidant components in the oil and extract of the pequi pulp are efficient to diminish the oxid nitric synthase isoforms, DNA damage and lipid peroxidation in an experimental model pulmonary chemical carcinogenesis, and suggest that the consumption of the fruit can be a good alternative to contribute in the treatment of lung cancer.

Key words. Lung Cancer, caryocar brasiliense camb, oxidative stress, antioxidants, DNA damage, lipid peroxidation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O termo câncer (CA) é a tradução latina da palavra grega carcinoma (de Karkinos) e foi utilizado pela primeira vez em 138-201d.C. Hoje em dia, o termo é usado para indicar qualquer neoplasia maligna (Valko et al., 2006).

Segundo Bogliolo, a neoplasia pode ser caracterizada pela proliferação celular anormal, descontrolada e autônoma na qual as células reduzem ou perdem a capacidade de se diferenciar, em consequência das alterações nos genes que regulam o crescimento e a diferenciação celular (Bogliolo, 2006).

Do ponto de vista clínico, comportamental e evolutivo, podem ser separadas em benignas e malignas. As benignas não causam grandes impactos fisiológicos para a vida do indivíduo e nem levam a morte, por outro lado as neoplasias malignas geralmente tem um crescimento rápido e muitas provocam graves desequilíbrios homeostáticos que podem levar o paciente a óbito (Carvalho et al., 2000; Cerutti, 1994).

O câncer afeta grande parcela da população mundial, sendo uma das principais causas de morte (Demarchi et al., 2000; Cooke et al., 2003; Bogliolo, 2006). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, todo ano, cerca de seis milhões de pessoas morrem devido a esta doença (WHO, 2002).

Por conta do seu crescimento celular anormal e incontrolado, que invade os tecidos vizinhos, o câncer pode surgir em qualquer parte do corpo, sendo alguns órgãos mais afetados do que outros, entre eles o pulmão (Uehara et al., 1998).

1.2 Câncer de pulmão

O câncer de pulmão (CP) constitui um grave problema de saúde, ocupando por sua morbidade e mortalidade, lugar de destaque entre as doenças de natureza neoplásica (Parra et al., 2010). De todos os tumores malignos, é um dos mais frequentes, perdendo apenas para o de pele e o de próstata em homens e o de mama em mulheres. O CP é o mais mortal e representa 28% das mortes (32% em homens, 25% em mulheres) por todos os tipos de câncer no mundo (Khan et al, 2005; American Cancer Society, 2013).

A idade média do diagnóstico é de 71 anos e a doença acomete principalmente idosos. Em cada três pessoas diagnosticadas, duas têm mais de 65 anos e apenas 2% de todos os casos diagnosticados, têm idade inferior a 45 anos (INCA, 2012).

A prevalência do CP tem aumentado, enquanto que nos últimos 20 anos a taxa de morte por neoplasias vem diminuindo nos países desenvolvidos. No Brasil, o CP foi responsável por 21.867 mortes em 2010, sendo 17.210 homens e 10.110 mulheres e a estimativa para 2013 é de 27.320 novos casos (Khan et al., 2005; INCA, 2012).

A prevenção, o diagnóstico precoce e o tratamento são as três principais abordagens para redução da morbimortalidade relacionadas ao câncer. No CP, o diagnóstico é mais difícil pelo fato da doença geralmente não apresentar sintoma até estar em estágio avançado; apenas 15% são diagnosticados precocemente (Fukushima et al., 2005). A alta mortalidade está diretamente relacionada com o diagnóstico tardio, quando as opções de tratamentos que restam são apenas paliativas (Ziegler et al., 1996; Khan et al., 2007).

O câncer de pulmão tem se mostrado de difícil controle com a terapêutica convencional, com um prognóstico geralmente ruim e com uma taxa de sobrevida média de 5 anos, que varia entre 13 e 21% em países desenvolvidos e 7 e 10% nos países em desenvolvimento (Khan et al., 2005; Howlader et al., 2011).

Segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde, o CP é histologicamente classificado em quatro tipos celulares principais: os carcinomas de células escamosas, os carcinomas de pequenas células, os adenocarcinomas e os carcinomas de grandes células dentre estes, o adenocarcinoma se destaca pela sua frequência e agressividade. Estes constituem 88% de todas as neoplasias primárias do pulmão (Travis et al., 2004).

1.3 Causas principais e fatores de risco para o câncer de pulmão

Os fatores desencadeantes do desenvolvimento da carcinogênese pulmonar são variados e alguns deles ainda pouco conhecidos. No CP, 90% dos casos diagnosticados estão relacionados ao tabaco. O fumo é capaz de aumentar o risco para esse tipo de câncer em 20 a 30 vezes nos tabagistas de longa data e em 30 a 50 vezes nos fumantes passivos, não existindo nenhuma dose ou quantidade segura para o consumo (Saad, 2006; INCA, 2013).

Outros fatores relacionados são a presença de certos agentes químicos no ambiente ocupacional, como o arsênico, asbesto, cromo, níquel, berílio, radônio, cádmio e cloreto de vinila, a doença pulmonar obstrutiva crônica, os

fatores genéticos e a história familiar de câncer de pulmão (Uehara, 1998; Saad, 2006).

Além destes, os fatores dietéticos apresentam destaque. Entre as mortes por todos os tipos de câncer atribuídas a fatores ambientais, uma dieta inadequada contribui com cerca de 35%, seguida pelo Tabaco (30%) e outros, como condições e tipo de trabalho, álcool, poluição e aditivos alimentares (Garófalo et al., 2004). Acredita-se que com uma dieta adequada seria possível a prevenção de 3 a 4 milhões de novos casos de câncer a cada ano (Glanz, 1997; Garófalo et al., 2004).

Estudos sobre o câncer de pulmão têm corroborado o papel preventivo da ingestão de frutas e hortaliças contra a doença. Foi demonstrado que mesmo um aumento moderado na ingestão de frutas e hortaliças, ricas em antioxidantes, apresentam proteção significativa contra o estresse oxidativo, que leva ao desenvolvimento da carcinogênese (Voorrips et al., 2000; WHO, 2002).

1.4 Modelos Experimentais de Câncer de Pulmão

O estudo dos mecanismos moleculares da doença é difícil na neoplasia humana. Devido a essa dificuldade e devido à semelhança que a carcinogênese em camundongos tem com a humana, tumores primários em camundongos têm servido como base para um instrutivo modelo de estudo. Recentemente, tem se utilizado um modelo experimental em camundongos no qual tumores pulmonares são induzidos por uretana (Reymão et al., 1997; Cury et al., 2000; Parra et al., 2010).

A uretana (carbamato de etila) é um composto com comprovada ação genotóxica tanto *in vitro* como *in vivo*, levando portanto ao estresse oxidativo (Mirvish, 1968). Apresenta uma ligação covalente ao DNA da célula e é considerado um carcinógeno animal, capaz de induzir ao câncer pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e pela depuração do DNA por seus metabólitos (Trainin, 1964). Ao mesmo tempo, a uretana, pode inibir ou reduzir a atividade das enzimas reparadoras de dano no DNA. Ele atua como um iniciador químico da carcinogênese, promovendo o desenvolvimento de nódulos pulmonares identificáveis em um período médio de quarenta e oito dias e a formação de tumores completamente desenvolvidos em cento e vinte dias. É amplamente utilizado no desenvolvimento da carcinogênese pulmonar experimental por ter uma importante afinidade pelas células pulmonares (Saad, 2006; Sakano et al., 2002; Zimmerli et al., 1991).

A indução de câncer pulmonar por uretana em camundongos obedece a um espectro de diferenciação que inclui focos de hiperplasia adenomatosa, hiperplasia adenomatosa atípica e adenocarcinomas plenamente desenvolvidos. Os adenocarcinomas resultantes constituem um excelente modelo de estudo da carcinogênese pulmonar (Reymão et al., 1997; Parra et al., 2010).

A utilização da uretana na indução desse tipo de câncer é um método simples e amplamente conhecido na literatura em modelos experimentais de câncer pulmonar (Ramasamy et al., 2011; Parra et al., 2010; Forkert, 2010; Minowada e Miller, 2009; Roomi et al., 2009 ; O'Donnel et al., 2006 ; Santiago et al., 2009; Saad, 2006; Singh et al., 2006 ; Vesnushkin et al., 2006; Simkeviciene et al., 2006 ; Sakano, et al., 2002; Zimmerli et al., 1991).

1.5 Espécies Reativas e Radicais Livres sobre as funções corporais

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbia e do metabolismo, sendo assim, as espécies reativas (ER) e radicais livres (RL) são produzidas naturalmente ou por alguma disfunção biológica (Mena et al., 2009).

Radicaís livres são moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados nos orbitais externos, o que confere a essas estruturas certo grau de reatividade, tornando-as capazes de reagir com qualquer composto situado próximo a sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora (Allen e Tresini, 2000; Bertram, 2008).

Espécie reativa é um termo que abrange todas as formas reativas de oxigênio ou nitrogênio, incluindo radicais e não-radicais que participam da iniciação e progressão das reações em cadeia envolvendo a formação de espécies radicalares (Ferreira e Matsubara, 1997). As ER cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio são denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs) e quando centrado nos átomos de nitrogênio são denominadas espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Allen e Tresini, 2000).

Essas espécies são formadas em um cenário de óxido-redução, provocando ou resultando de tais reações. Podem receber um elétron e serem reduzidos ou podem ceder o elétron desemparelhado e serem oxidados. Essas reações ocorrem no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular, sendo seus alvos as proteínas, os lipídeos, os carboidratos e as moléculas do DNA (Bianchi e Antunes, 1999).

As mitocôndrias consomem mais de 90% do oxigênio disponível no

organismo, sendo o principal sítio celular de formação de EROs: cerca de 2-3% do oxigênio escapam da redução à água na via respiratória e se transformam em RL, principalmente o íon superóxido ($O_2^\bullet$) e o peroxinitrito (ONOO). Outro sítio importante é o retículo endoplasmático, onde o citocromo CYP 450 produz EROs e os utiliza em processos de detoxificação de drogas, tais como o benzeno, álcool, inseticidas, entre outros. Além dessas fontes endógenas já citadas, outras como os fagócitos de defesa imune primária e enzimas como a xantina desidrogenase/oxidase também merecem destaque (Ferreira e Matsubara, 1996; Cibeira e Guaragna, 2006; Cerqueira et al., 2007).

As fontes exógenas que levam a formação de RL são variadas: radiação gama e ultravioleta, poluição, pesticidas, álcool, alimentos, entre outros. O fumo é uma importante fonte exógena, já que os óxidos de nitrogênio produzidos durante a combustão do cigarro oxidam macromoléculas biológicas e diminuem o nível de antioxidantes no organismo, o que contribui para o desenvolvimento das inúmeras doenças associadas ao fumo, dentre elas o CP (Menezes et al., 2002).

A geração dos radicais livres constitui uma ação contínua e fisiológica, cumprindo funções biológicas essenciais. Eles desempenham um papel duplo nos sistemas biológicos, podendo ser prejudiciais ou benéficos para o organismo. Esse delicado equilíbrio entre os efeitos benéficos ou prejudiciais é chamado de “balanço redox” (Mena et al., 2009).

No organismo, em concentrações baixas ou moderadas, as ER encontram-se envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (Wu e Cederbaum, 2003). No entanto, altas concentrações podem

levar ao estresse oxidativo, sendo os danos causados no DNA ou RNA os mais graves por estarem relacionados com a quebra nas estruturas das bases causando o reposicionamento das mesmas, sendo um importante fator relacionado à carcinogênese. Da mesma forma alterações nos aminoácidos das enzimas podem fazer com que eles percam a sua atividade ou ainda assumam uma atividade diferente (Sergent et al., 2001; Wu e Cederbaum, 2003).

A oxidação lipídica também chamada de peroxidação lipídica, pode desencadear uma reação em cadeia que tem como consequência a perda da seletividade na troca iônica e a liberação do conteúdo das organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos e a formação de produtos citotóxicos, como o malonaldeído (MDA), que culmina com a morte celular (Aikens, 1991; Pilai et al., 2004).

Os metais de transição, principalmente Ferro (Fe^{+}) e Cobre (Cu^{+}), podem catalisar as reações de oxi-redução, desempenhando um importante papel na formação de diversos EROs e ERNs, desta forma estão indiretamente relacionados com o dano oxidativo (Ferreira e Matsubara, 1997; Valko et al 2006).

Dessa forma, o dano celular causado pelas ER podem estar relacionadas com diversas patologias como doenças cardiovasculares, neurológicas ou neoplásicas, podendo ser a causa principal ou o fator agravante de um modo geral (Cerutti, 1994; Bianchi e Antunes, 1999; Bertram e Hass, 2008).

1.6 Espécies Reativas de oxigênio (EROs)

O próprio oxigênio (O_2) em seu estado fundamental é um radical, portanto, a partir do momento em que acontece a respiração inúmeras EROs começam a ser formadas. Embora o O_2 não seja reativo com a maioria dos componentes celulares, sua reação com outros radicais livres (RL) e com íons de metais de transição, como Fe^{+} e Cu^{+} , resultam em uma variedade de ER, que podem iniciar reações em cadeias e atacar biomoléculas (Toyokuni, 1995; Steen, 2000).

Dentre as espécies reativas as mais importantes são:

- **O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$)**, considerada a espécie reativa “primária”, por ser a primeira espécie a ser formada e em seguida reagir com outras moléculas para formar as chamadas espécies reativas “secundárias” (Barreiros et al., 2006).
- **Os EROs**, distribuem-se em 2 grupos: os radicalares como a hidroxila ($HO^{\bullet}$), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peroxila ($ROO^{\bullet}$) e alcoxila ($RO^{\bullet}$); e os não radicalares: oxigênio (O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo o $HO^{\bullet}$ o mais deletério para o organismo devido a sua meia vida muito curta e pela sua ligação com o desenvolvimento de mutações no DNA (Steen, 2000).

1.7 Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN)

O óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) é uma ERN abundante no organismo atuando como uma importante molécula biológica oxidativa de sinalização em diversos

processos fisiológicos, como na neurotransmissão, na regulação da pressão arterial, nos mecanismos de defesa, no relaxamento muscular, na vasodilatação e na regulação imunológica. Além disso, tem uma importante função citotóxica e citostática (Fujimoto et al., 1997; Lechner et al., 2005). O NO• é gerado em tecidos biológicos pelas óxido nítrico sintases (NOS), que metabolizam a arginina em citrulina até a sua formação. Uma importante fonte endógena de NO• é através das células do sistema imunológico que produzem tanto o O₂•- como o NO• durante a explosão oxidativa desencadeada durante processos inflamatórios. Nessas circunstâncias, ambos podem reagir entre si produzindo quantidades significativas de uma molécula ainda mais oxidante, o ânion peroxinitrito (ONOO) que pode causar a fragmentação do DNA e a peroxidação lipídica (Laval et al., 1997; Sandau et al., 1997; Aaltoma et al., 2000).

Acredita-se que os efeitos indiretos da inibição dos sistemas de reparo do DNA pelas ERNs possam desempenhar um papel importante na carcinogênese (Lechner et al., 2005).

Existem três isoformas das NOS: óxido nítrico sintase neuronal (nNos ou NOS 1), óxido nítrico sintase indutível (iNOs ou NOS 2) e o óxido nítrico sintase endotelial (eNos ou NOS 3) (Fujimoto et al., 1997).

A NOS 1 está localizada nas células neuronais enquanto a NOS 3 está localizada nas células vasculares endoteliais; ambas possuem sistemas dependentes de cálcio e produzem NO como mecanismo de transdução de sinal. A NOS 2, está localizado nos macrófagos e é induzida por citocinas e endotoxinas, na maioria das vezes independente de cálcio e promove uma liberação prolongada de NO, mediando os efeitos citostáticos e citotóxicos do

sistema imunológico (Sandau et al., 1997; Aaltoma et al., 2000; Lechner et al., 2005).

1.8 Estresse Oxidativo e Carcinogênese

A carcinogênese é um processo complexo que ocorre em múltiplas etapas, como esta demonstrada na Figura 1, sendo elas a iniciação, a promoção e a progressão (Bogliolo, 2006).

A iniciação é o processo de transformação celular que promove alteração irreversível no DNA (mutação), essa fase pode ser induzida por carcinógenos físicos, químicos ou biológicos que causam modificações genéticas nas células, tornando-as capazes de se multiplicar de maneira autônoma. A promoção corresponde a fase de proliferação ou expansão das células iniciadas, que diferente da iniciação é um processo mais demorado, já que os agentes promotores atuam pelo tempo de exposição e intensidade das reações teciduais que provocam. A progressão é o resultado das modificações biológicas que as células neoplásicas sofrem, desde seu surgimento até seus graus mais agressivos de malignidade (Cerutti, 1994; Bogliolo, 2006).

Figura 1. As fases do desenvolvimento da carcinogênese: a figura exemplifica o processo de transformação celular que leva a mutação, que acontece na iniciação e que pode ser induzida pelos carcinógenos, a promoção e a progressão, onde o tumor se torna maligno. *Adaptado de Bogliolo, 2006.*

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de radicais livres, em particular as espécies reativas de oxigênio e a capacidade de defesa do organismo contra essas espécies, levando a um progressivo e acumulativo dano oxidativo (Andersen, 2004; Valko et al., 2006).

O dano oxidativo está diretamente relacionado ao processo de carcinogênese (Valko et al., 2006), já que as espécies reativas de oxigênio podem agir nas três etapas básicas da carcinogênese (Halliwell e Gutteridge, 2000, Bogliolo).

As modificações permanentes do material genético, resultantes do dano oxidativo no DNA, representam a primeira etapa relacionada à mutagênese e a carcinogênese. Têm sido observado que mutações, deleções ou amplificações do material genético causadas pelos estresse oxidativo são as primeiras etapas para o desenvolvimento da carcinogênese (Diplock et al., 1998; Min e Ebeler, 2008).

Além disso, altos níveis de malonaldeído (MDA) resultantes da peroxidação lipídica foram relacionados com dano oxidativo no DNA. O MDA, em amostras biológicas é um importante indicador do grau do estresse oxidativo (Lima e Abdalla 2001; Arts et al., 2003).

Com o dano oxidativo, várias vias biológicas são desreguladas, resultando no aumento da expressão de alguns mediadores que podem interferir diretamente nas etapas da carcinogênese, como é o caso do NO• (Asano et al., 1994). O NO• assim como suas isoformas NOS 1, NOS 2 e NOS 3 têm mostrado um importante papel no crescimento, progressão e metástase de diferentes tipos tumorais. Estas moléculas estão presentes e algumas aumentadas no câncer de pulmão, especialmente no adenocarcinoma (Singh et al., 2006, Fujimoto et al., 1998, Ambros et al., 1998).

O aumento na produção do NO• pode estar implicado em diferentes fases que levam a malignidade celular, como por exemplo a transformação de células normais (ativação de oncogenes, perda da atividade anti-oncogenes), crescimento das células transformadas (diferenciação, proliferação, progressão tumoral), angiogênese, invasão local – característica de malignidade e metástase (Fujimoto et al., 1997, Lechner et al., 2005).

Estudos mostram que agentes que possam atuar na inibição do NOS 3

possam prevenir a progressão do câncer de pulmão. A NOS 3 promove angiogênese pelo aumento da permeabilidade vascular, oxigenação, fluxo sanguíneo e densidade capilar (Singh et al., 2006; Liu et al., 1998, Ambbs et al., 1998, Asano et al., 1994).

O estresse oxidativo pode resultar de uma situação em que há uma diminuição da defesa antioxidante, uma produção aumentada de espécies reativas ou uma combinação das duas. O organismo tem a capacidade de produzir compostos que apresentam grande capacidade de defesa antioxidante, direta ou indireta, atuando a fim de manter o estado de equilíbrio celular (Barreiros et al., 2006; Valko et al., 2006).

1.9 Defesa Antioxidante

Os efeitos deletérios das espécies reativas podem ser equilibrados pelos antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos. Essa defesa é fundamental para a manutenção do equilíbrio oxidativo (Nepomuceno, 2005).

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação do substrato (Halliwell, 1995).

Para ser considerado bom antioxidante, algumas características devem ser observadas: a capacidade de doar elétrons ao radical, em função de seu potencial de redução; a capacidade do deslocamento do radical formado em sua estrutura; a capacidade de quelar metais de transição como Fe^{+} e Cu^{+} e o acesso ao local de ação, que vai depender de sua hidrofília ou lipofília (Manach et al., 2004).

As defesas do organismo contra as espécies reativas podem ser

divididas em dois grupos: as defesa antioxidante endógenas e exógenas.

1.10 Defesa Antioxidante Endógena

As enzimas antioxidantes mais eficientes envolvem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (Silva e Naves, 2001).

A superóxido dismutase é um dos mais eficientes antioxidantes celulares endógenos, por catalisar a reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em O_2 e é em uma espécie reativa menos deletéria, o H_2O_2 , conforme a reação a seguir:

Nas mitocôndrias a SOD se encontra ligada em seu sítio ativo ao magnésio (MnSOD), e no citosol celular possui cobre e zinco em seu sítio ativo (CuZnSOD) (Halliwell, 1996; Quin et al., 2008).

A Catalase (CAT) é uma das enzimas mais abundantes na natureza, encontrando-se amplamente distribuída no organismo humano, nas mitocôndrias e nos peroxissomos. Sua atividade varia de acordo com o órgão ou tecido em que se localiza, sendo mais elevada no fígado e nos rins; mais baixa, nos tecidos conjuntivo e epitelial (Gutteridge e Halliwell, 2000). Essa enzima é muito eficaz e promove a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, conforme demonstrado abaixo:

Existe um importante equilíbrio que deve ser mantido entre a atividade da Superóxido dismutase e da Catalase (Quin et al., 2008).

A Glutathione peroxidase (GPx) é uma enzima dependente de selênio e localizada primeiramente no citosol e na matriz mitocondrial (Silva e Naves, 2001).

O metabolismo da glutathione é um dos principais mecanismos de defesa antioxidante. A glutathione peroxidase catalisa a redução do hidroperóxido e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) às custas da glutathione (GSH), catalisando a peroxidação da GSH, tendo como produto a glutathione na forma dissulfeto oxidada (GSSG) (Wang et al., 2008, Halliwell, 1996). Essa reação está exemplificada abaixo:

Outros compostos de baixo peso molecular também atuam como antioxidantes endógenos em alguns sistemas, são eles: glutathione, ácido úrico, bilirrubina, ubiquinona, albumina (Muraoka e Miura, 2003, Halliwell et al., 2000).

Como uma resposta fisiológica a situações de estresse oxidativo, o organismo aumenta o nível dos antioxidantes endógenos como o ácido úrico, a glutathione e as enzimas antioxidantes (Benzie et al., 2003).

Estudos recentes correlacionaram positivamente o aumento da atividade dessas enzimas ao consumo de frutas e outros vegetais com potencial antioxidante (Wang et al., 2005; Kim et al., 2008; Céspedes et al., 2008).

1.11 Defesa Antioxidante Exógena

A alimentação tem uma importância fundamental na prevenção do dano oxidativo pois proporcionam substâncias antioxidantes que tem a capacidade de interagir com EROs ou ERNs e com metais de transição (Fe^+ , Cu^+) diminuindo-as. Desta forma, o balanço antioxidante do organismo pode ser alterado de duas formas: pelo aumentando do consumo de alimentos ricos em substâncias antioxidantes ou pela diminuição de alguns alimentos ricos em substâncias mais susceptíveis de serem oxidados (Ferreira e Matsubara, 1997; Cerqueira et al., 2007).

Vários estudos mostram que os alimentos são fontes de inúmeros nutrientes que atuam de forma cooperativa na prevenção do estresse oxidativo e por conseguinte, na prevenção de várias doenças, dentre eles os mais estudados são as vitaminas C e E, os carotenóides e os compostos fenólicos. Estudos com frutas, verduras e legumes apresentam resultados positivos do que diz respeito a proteção do organismo contra as ER (Khan et al., 2007; Mena et al., 2009).

Ainda existem algumas dúvidas com relação à ingestão de antioxidantes, entre elas está a inexistência de uma ingestão recomendação para cada tipo antioxidante; a falta de padronização quanto ao real valor antioxidante dos alimentos; e os possíveis efeitos tóxicos da administração de elevadas doses de antioxidantes (Silva e Naves, 2001).

- **Vitamina E**

Compreende todos os derivados tocoferóis e tocotrienóis e é encontrada no fígado, nos rins e no tecido adiposo. São compostos altamente lipofílicos e por esse motivo é mais efetivo na fase lipídica; sua função antioxidante consiste principalmente em inibir a peroxidação lipídica (Serracarbassa, 2006; Cerqueira et al., 2007).

As principais fontes da Vitamina E na dieta são os óleos vegetais, gérmen de trigo e oleaginosas (Sies e Stahl, 1995).

- **Vitamina C**

Possui uma potente atividade redutora, capaz de reduzir a maioria das EROs e ERNs fisiologicamente relevantes. Embora seja hidrossolúvel, participa do mecanismo protetor contra a oxidação lipídica por regenerar a Vitamina E (Bonney e Kostka, 2002).

As principais fontes da Vitamina C na dieta são frutas como laranja, kiwi, morango e acerola (Bianchi e Antunes, 1999).

- **Carotenóides**

Os carotenóides são compostos lipossolúveis com propriedades antioxidantes devido a sua alta capacidade de sequestrar RL e desativar espécies reativas de oxigênio (Rodrigues-Amaya, 1997).

Já foram identificados mais de 600 carotenóides estruturalmente

diferentes, e quarenta deles são encontrados na dieta humana, destes 90% são representados por alfacaroteno, betacaroteno, licopeno, luteína e criptoxantina (Sies e Stahl, 2005; Podsedek, 2007).

Foi demonstrado por Peto, Doll e Sporn em 1981, que existe uma relação inversa entre o risco de câncer e o consumo de produtos ricos em carotenóides. O betacaroteno é carotenóide mais presente na dieta humana, e desde então os estudos relacionados com a sua ação antioxidante vêm aumentando (Peto et al., 1981).

O betacaroteno é encontrado principalmente em frutas e vegetais de coloração amarela e verde como cenoura, espinafre, damasco, batata doce, brócolis e pêsego, e tem importante papel na manutenção da saúde, atuando como potente antioxidante e como matéria prima para a produção metabólica de retinol e vitamina A (Rao e Rao, 2007).

Em 1998, a “International Agency for Research on Cancer” concluiu que havia evidências suficientes sobre a atividade câncer preventiva do betacaroteno em modelos de animais experimentais (IARC, 1998).

Estudos epidemiológicos mostraram que pessoas que têm maior consumo de carotenóides e aquelas que têm alto índice plasmático de betacaroteno, têm um risco menor de desenvolver câncer de pulmão; sugeriu-se que o betacaroteno possa bloquear a carcinogênese e inibir o crescimento de células tumorais específicas por sua ação antioxidante, pelo aumento da capacidade imunológica, por ser precursor do ácido retinóico e por induzir enzimas de detoxificação de carcinógenos (Cerutti et al., 1994; Olson, 1998).

No entanto ainda existem controvérsias em relação aos carotenóides, pois estudos mostraram que em concentrações elevadas a capacidade

antioxidante do licopeno, da luteína e do betacaroteno foi diminuída e esses apresentaram efeitos pró-oxidantes. Além desses, outros dois grandes estudos que usaram altas doses de betacaroteno em humanos fumantes demonstraram um aumento no risco de câncer de pulmão, (ATBC, 1994; Albanes et al., 1996; Omenn et al., 1996).

- **Compostos Fenólicos**

Os compostos fenólicos são os antioxidantes mais abundantes na dieta, sendo que sua maior concentração está nas frutas, nas hortaliças e em seus derivados. Podem ser encontrados em diversos alimentos, mas o chá verde, o cacau, o açaí, a soja e o pequi destacam-se por sua presença (Cerqueira et al., 2007).

Apesar da sua distribuição abundante na alimentação os efeitos desses componentes na saúde humana tornaram-se foco de atenção apenas na década de 90 (Cerqueira et al., 2007; Ferreira e Matsubara, 1997).

Entre as classes mais estudadas estão os flavonóis, catequinas, antocianidinas e isoflavonas. Vários estudos com ação preventiva de doenças relacionadas ao estresse oxidativo já foi atribuído ao potencial antioxidante desses compostos (Hassimoto et al., 2005; Beutler et al., 2002; Pukaskas et al., 2005; Miles et al., 2002).

Em estudos *in vitro*, foi demonstrado que os compostos polifenólicos encontrados nas plantas, podem participar de processos anti-carcinogênicos devido ao seu alto potencial antioxidante capaz de captar radicais livres implicados nos processos de carcinogênese como o $O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, $NO^{\bullet}$ e $ONOO^{\bullet}$.

(Manach et al., 2004, Karakaya, 2004).

Ao contrário da Vitamina C e E os compostos fenólicos têm a propriedade de atuar em meios aquosos e lipídicos, o que os tornam compostos de ação mais rápida que as vitaminas citadas anteriormente (Cerqueira et al., 2007).

Os compostos fenólicos tem várias vias de ação antioxidante, entre elas a doação de elétrons para os radicais livres; a quelação de metais de transição, como o Fe^{+} e o Cu^{+} , a reparação da lesão das moléculas atacadas por ER (Podsdek, 2007; Kuti e Konuru, 2004).

1.12 O Pequi (*Caryocar brasiliense camb*) como Antioxidante

O *Caryocar brasiliense camb*, mais conhecido como pequi, é um fruto nativo do cerrado brasileiro e proveniente da árvore chamada pequizeiro (Figura 2). O pequizeiro tem ampla utilização pela população desta região, sendo considerado o “rei do cerrado” devido a seu alto valor econômico, sua madeira é utilizada como matéria prima para a construção de barcos e as suas folhas e frutos são considerados com alto valor nutritivo (Almeida e Silva, 1994; Kerr et al., 2007). Devido a sua difícil germinação seu cultivo é limitado. Sua frutificação ocorre principalmente entre os meses de janeiro a março (Ribeiro, 2000).

Figura 2. O pequizeiro. É uma árvore do cerrado brasileiro de difícil germinação o que torna seu cultivo restrito a essa região.

O fruto está constituído por uma envoltura externa de coloração esverdeada chamada de exocarpo, uma região intermediária de coloração amarelo claro que é dividida em duas regiões, o mesocarpo externo e o mesocarpo interno, este último é a porção comestível do fruto e finalmente o endocarpo que é parte espinhosa que protege a amêndoa ou semente, que também é comestível (Araújo, 1995).

Figura 3. O fruto pequi. A Figura 3A representa o fruto do pequi com a casca. A Figura 3B mostra o fruto aberto e representa a porção comestível do fruto. Ele pode

conter até 04 “caroços” em seu interior. A Figura 3C mostra a polpa do pequi, bastante utilizada na culinária de alguns estados do país e a parte espinhosa que protege a semente.

O pequi é consumido principalmente nas regiões onde é produzido, sendo o estado de Minas Gerais um de seus principais produtores e consumidores (Ribeiro, 2000).

Sua polpa é muito utilizada na elaboração de diferentes pratos e pode ser consumido misturado com arroz, feijão, frango e o tradicional baião de três: arroz, feijão e pequi. Já a amêndoa é utilizada como ingrediente de farofas, doces e paçocas, além de ser também consumida salgada como petisco (Ribeiro, 2000; Perez, 2004).

A polpa do pequi fornece 385 Calorias a cada 100gr, e constitui uma importante fonte de fibra alimentar (10,02%), lipídeos (33,4%) e proteínas (3%) (Lima et al., 2007; Miranda-Vilela et al., 2009). Dentre a composição de lipídeos existente na polpa 37,97% são de ácidos graxos saturados e 61,35% são de ácidos graxos insaturados. A composição dos ácidos graxos está detalhado na tabela a seguir:

Tabela 1. Composição Percentual de ácidos graxos da polpa do pequi.

Ácidos Graxos	% Presente na Polpa
Oléico	55,87
Mirístico	0,13
Palmitico	35,17
Láurico	0,04
Esteárico	2,25
Linoléico	1,53
Araquídico	0,23
Gadoléico	0,27
Cis-vacênico	1,90
Alfa-Linoléico	0,45

Fonte: Lima et al., 2007.

Além disso a polpa do pequi é uma fonte considerável de magnésio ($1,48 - 1,97 \text{ g.kg}^{-1}$), zinco ($21,76 - 27,03 \text{ mg.kg}^{-1}$), ferro ($15,13 - 18,06 \text{ mg.kg}^{-1}$), cobre ($7,90 - 11,04 \text{ mg.kg}^{-1}$), fósforo ($1,08 - 2,06 \text{ g.kg}^{-1}$) e cálcio ($1,34 - 2,01 \text{ g.kg}^{-1}$), além de ser uma potencial fonte de vitamina C, contendo 78,3mg a cada 100g do fruto (Ramos et al., 2001; Mariano-da-Silva, 2009).

Pelo fato do fruto ser encontrado em regiões onde as árvores estão sujeitas a altas incidências de raios solares, a geração de radicais livres é favorecida. Essa condição favorece a biossíntese de compostos secundários com propriedades antioxidantes, como os carotenóides e compostos fenólicos (Lima et al., 2007; Kerr et al., 2007).

Já foi identificado na polpa do fruto após o seu cozimento convencional, a presença de diversos carotenóides como o betacaroteno, criptoflavina, criptoxantina, anteraxantina, zeaxantina e mutaxantina. A composição de carotenóides totais presentes na polpa atinge a concentração de 7,25mg por 100g de polpa, (Almeida & Silva, 1994; Ramos et al., 2001).

Tabela 2. Composição de carotenoides na polpa do pequi

Carotenóides	Teor (%)
Anteraxantina	40,54
Zeaxantina	34,24
Criptoflavina	7,70
Betacaroteno	6,35
Beta-Criptoxantina	5,25
Mutatoxantina	1,87

Fonte: Ramos et al., 2001.

A concentração de compostos fenólicos totais é de 209mg por 100g de polpa, sendo essa concentração superior a muitas das frutas bastante consumidas no Brasil, como o açaí, o morango e o abacaxi (Lima et al., 2007; Araújo, 1995).

Tabela 3: Ácidos fenólicos identificados na polpa do pequi

Ácidos fenólicos	Polpa (µg/g)
Ácido elágico	136,7
Ácido p-cumárico	34,71
Ácido Gálico	13,81
Ácido p-hidrobenczóico	0,56

Fonte: Lima, 2008.

2. HIPÓTESE

Embora já esteja bem evidenciado na literatura que os antioxidantes provenientes da dieta desempenham um papel fundamental no equilíbrio oxidativo, alguns estudos tem demonstrado ações contraditórias na utilização de antioxidantes isolados no tratamento e na prevenção de doenças relacionadas ao dano oxidativo, como no tratamento coadjuvante do câncer de pulmão (Cerqueira et al., 2007; Barreiros et al., 2006; Bianchi e Antunes, 1999).

Existem ainda poucos estudos que abordem os efeitos dos compostos antioxidantes presentes no pequi e nenhum estudo mostrando a ação do pequi no câncer de pulmão.

Devido ao delicado balanço entre os oxidantes e os antioxidantes, são importantes mais pesquisas de compostos alimentares que ajudem nesse equilíbrio, desta forma levantamos a hipótese que os compostos antioxidantes presentes no Pequi possam diminuir o estresse oxidativo inibindo os danos oxidativos causados pela uretana em um modelo experimental de carcinogênese pulmonar.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar *in vivo* se o óleo e o extrato do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) podem exercer um efeito protetor ao dano oxidativo induzido pelo carcinógeno uretana.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 Avaliar através de ensaios bioquímicos no no tecido pulmonar de animais iniciados com a uretana e suplementados com o Pequi:

- a) Atividade das principais enzimas antioxidantes Catalase, Superóxido Dismutase e Glutathione Peroxidase;
- b) Grau de dano oxidativo no DNA pelo Teste do Cometa
- c) Peroxidação lipídica mediante a técnica do Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS)

3.1.2 Determinar no no tecido pulmonar de animais iniciados com a uretana e suplementados com o Pequi:

- d) Expressão gênica das isoformas de NOS1, NOS2 e NOS3, através da técnica qRT-PCR
- e) Expressão protéica das NOS, através da técnica de imunohistoquímica,

3.1.3 Comparar o efeito protetor do dano oxidativo induzido pelo carcinógeno uretana nos animais suplementados com óleo e extrato do pequi (*Caryocar brasiliense Camb*) e betacaroteno.

4. MÉTODOS

4.1 Desenho Experimental

4.1.1 Animais Utilizados

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Comitê de ética interno do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram utilizados 40 camundongos machos, isogênicos, de 8 a 12 semanas, da linhagem BALB/c, pesando entre 25 e 30 gramas, obtidos do biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram distribuídos de forma aleatória em 5 grupos. Durante o experimento, os animais foram mantidos no biotério da Clínica Médica LIM 17, em gaiolas plásticas com 5 animais por caixa, devidamente etiquetadas e com livre acesso a água e comida, como mostra a figura 4.

Figura 4. Camundongos Balb/C. Os animais foram mantidos em gaiola plásticas, etiquetadas e com livre acesso a água e comida.

4.1.2 Indução da Carcinogênese Pulmonar

Os animais foram induzidos à carcinogênese mediante a duas doses de injeção intra-peritoneal do carcinógeno químico uretana na concentração de 1,5g/kg dose (Parra et al., 2010).

4.1.3 Compostos Utilizados na Gavagem:

Os compostos Utilizados na gavagem dos animais foram o óleo e o extrato do pequi cedidos pela Universidade de Brasília, em colaboração com o Professor Cesar Koppe Grisolia (*Patente: 10601631-6*). Estes compostos foram mantidos em embalagens escuras, etiquetadas e fechadas, para evitar a sua oxidação, até o momento da gavagem. O óleo de milho utilizado na diluição do betacaroteno (β -carotene C9750, Sigma Aldrich, Califórnia, EUA) foi adquirido de uma farmácia de manipulação chamada Drogaderma, localizada na cidade de São Paulo. Em todo o momento, ele foi mantido em embalagem escura.

4.1.4 Grupos e Gavagem

A dose ideal de óleo e extrato de pequi utilizada para o projeto foi instituída mediante a realização de dois pilotos e segundo trabalhos publicados com a utilização desses compostos (Khoury, et al., 2006; Miranda-Vilela et al., 2009; Miranda-Vilela et al., 2010; Miranda-Vilela et al., 2008; Miranda-Vilela et al., 2007).

A dose do betacaroteno foi calculada através da fórmula de transformação de doses desenvolvida por Reagan-Shaw et. al, utilizando uma

dosagem próxima à da recomendação nutricional preconizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para carotenóides pró-vitamina A (Reagan-Shaw et al., 2007).

A gavagem foi iniciada no dia da indução da carcinogênese e foi realizada durante os dois meses seguintes à indução. A gavagem aconteceu diariamente nesse período (Figura 5).

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- **Grupo Controle** (C=5), animais que não receberam gavagem e nem as doses de uretana.
- **Grupo iniciado com uretana** (U=5), receberam as 2 doses de uretana e não receberam gavagem;
- **Grupo iniciado com uretana mais gavagem do extrato** (U+E=10), animais que receberam duas doses de uretana, e foram gavados com 15 µL de extrato etanólico de pequi;
- **Grupo iniciado com uretana mais gavagem de óleo** (U+O=10), animais que receberam as doses de uretana e foram gavados com 15 µL de óleo de pequi,
- **Grupo iniciado com uretana e mais gavagem de betacaroteno** (U+B=10), animais que receberam as doses de uretana e foram gavados com 3µg/kg de betacaroteno diluído em óleo de milho.

Figura 5. Gavagem. Os animais Balb/C receberam a gavagem durante sessenta dias consecutivos.

4.1.5 Eutanásia

Os animais foram anestesiados com uma mistura letal de quetamina (200 μ g/g) e xilasina (10 μ g/g) através de uma injeção intraperitoneal. Posteriormente, foram exsanguinados por secção da aorta abdominal, com retirada dos pulmões e coração em monobloco. A seguir, os pulmões foram divididos da seguinte forma: o lobo direito foi dividido em 3 partes iguais e o lobo esquerdo foi dividido em 2 partes iguais. Essas três partes foram colocadas em tubos criogênicos separados, devidamente etiquetados e identificados e armazenados em freezer a -80°C.

Dos dois fragmentos restantes, um foi imediatamente macerado para o teste do cometa e o lobo que foi para análise microscópica foi insuflada através de um catéter introduzido na traquéia com formol a 10% (10ml/Kg) e seccionada transversalmente. Esses fragmentos foram então, deixados em formalina a 10% por 24h para sua fixação. Os fragmentos fixados em formalina

foram embebidos em parafina. Os blocos obtidos, então, foram seccionados a três micrômetros de espessura e corados mediante a técnica histoquímica de HE.

4.2 Determinação da atividade antioxidante enzimática em tecido pulmonar

A atividade antioxidante enzimática foi analisada no Laboratório de Estresse Oxidativo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em colaboração com o Professor Dr. Daniel Pens Gelain e inclui:

4.2.1 Catalase em placa (CAT):

Para o teste da catalase o tecido pulmonar foi preparado da seguinte maneira: ele foi suspenso em 1ml em tampão fosfato contendo NaH_2PO_2 (Sodium Hypophosphite Hydrate - Merck Chemicals, Darmstadt, Ge) $2\text{H}_2\text{O}$ 20mM (Hydrogen Peroxide solution 20mM - Merck Chemicals, Darmstadt, Ge), KH_2PO_4 (Potassium Phosphate Monobasic - Merck Chemicals, Darmstadt, Ge) e água. Em seguida homogeneizado $4 \times 10''$ em potência 4. Centrifugado 3000g por 10 minutos (para limpeza da amostra). O sobrenadante foi separado e o Pellet foi descartado. A amostra foi diluída em Tampão CAT. O leitor de placas (espectrofotômetro) foi mantido a 37°C na hora da leitura e foram utilizadas placas para UV. Com o uso de uma pipeta, foi adicionado 10ul de amostra em cada poço da placa utilizada. Em seguida, com o uso de uma pipeta foi acrescentado o tampão catalase “puro” (sem peróxido) até completar o volume

de cada poço pra 200ul. Logo depois foi pipetado 5ul de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em cada poço. A leitura da placa aconteceu durante 5 min. em 240nm em placa (15 em 15 segundos). Cálculo: para descobrir o valor do “branco”, foi feita uma média dos valores dos 5 minutos e descontado dos valores da ABSorvância final e ABSorvância inicial de cada amostra (branco de cada amostra), antes de aplicar na fórmula. Foi aplicado ($Abs_{inicial} - Abs_{final}$) com delta de um minuto (aos valores dos minutos iniciais).

$$\text{(Catalase U/mg proteína = } \frac{2,361 \times 0,67 \times (abs_{inicial} - abs_{final})}{abs_{inicial} \times \text{mg proteína}} \text{)}$$

Sendo: 0.67 = fator de correção do método da cubeta em relação à placa, caminho óptico; *mg proteína = quantidade de proteína (em mg) pipetada no poço.

O resultado da catalase se dá por Unidade de catalase por miligrama de proteína (UCAT/mg de proteína)

4.2.2 Superóxido Dismutase (SOD):

Para o teste da SOD o tecido foi homogeneizado em tampão PBS, e centrifugado 3000g/10min (para limpeza da amostra).

Pipetagem das placas: primeiro foi adicionado 5ul de catalase (Catalase Lyophilized - Merck Chemicals, Darmstadt, Ge) 10 uM (Catalase 0,0024g; H_2O destilada 1mL) em cada poço com uma pipeta multicanal. Foram feitas quadruplicatas de cada amostra, sendo pipetadas 5uL, 10uL, 15uL, 20uL de cada uma delas e completadas respectivamente com 185uL, 180uL, 175uL e

170uL de tampão glicina (Glycine - Merck Chemicals, Darmstadt, Ge) 50mM - (Glicina 0,75g, 200ml H₂O) – (Volume Final em cada poço 190uL + 5ul de CAT). Foram deixados 8 poços para a auto oxidação da adrenalina com 190uL de tampão + 5ul de CAT. O branco foi lido no leitor de placas (espectrofotômetro) sem a adição de adrenalina.

Foi adicionada 5ul de adrenalina, e as absorções foram monitoradas no leitor de placa durante 6 minutos de 10 em 10 segundos (480nm) – o leitor de placas foi regulado para 32°C.

Cálculo: 1 unidade de SOD é a quantidade de enzima capaz de decrescer em 50% a formação de superóxido num sistema. Cada amostra apresentou curvas cinéticas de 18 pontos cada uma. Foram escolhidos pontos lineares e retirados os pontos de não linearidade da curva. Foi calculado o ângulo da reta dos pontos selecionados e a porcentagem do ângulo da amostra em relação ao ângulo da auto oxidação da adrenalina (que é o 100% de formação de superóxido, ou 0% de SOD), e então tivemos a porcentagem de formação de superóxido. Foi feita a equação do gráfico (Volume de amostra x % formação do superóxido) e com isso foi pedida a equação da reta. Pela equação da reta foi achado o Y=50 (volume de amostra que inibe 50% a auto oxidação da adrenalina = 1 U SOD). Pela concentração de proteína da amostra, foi calculado quanto de proteína (mg) foi necessário para ter esses 50% inibição da auto oxidação. Dividindo o 1 pela quantidade de proteína nesse volume (mg) = 1/mg proteína = U SOD/mg proteína.

O resultado da SOD se dá por Unidade de SOD por miligrama de proteína (USOD/mg de ptn).

4.2.3 Glutathione Peroxidase (GPx) em placa:

Para o teste da glutathione o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 50mM contendo KH_2PO_4 (Potassium Phosphate Monobasic - Merck Chemicals, Darmstadt, Ge) e EDTA 1mM (Ethylenediaminetetraacetic Acid - Sigma Aldrich, St Luis, USA). Em seguida foi adicionado com a utilização de uma pipeta 20uL da amostra em cada poço da placa, exceto no BRANCO (onde foi pipetado 20uL de tampão). Logo depois foi pipetado 20uL de NADPH 5mM (NADPH – 0,084g, NaHCO_3 – 2mL) em todos os pontos. Em seguida, aconteceu a pipetagem de 120uL de tampão 20mM em cada ponto, já nos pontos brancos (que foram 4) foi pipetado 140uL do mesmo.

A placa foi incubada por 10 minutos a 37°C, dentro do leitor de placas, e depois pipetado 10uL de Glutathione 40mM contendo (L-glutathione reduced – Sigma Aldrich, St Luis, USA e água mili-Q) + 10uL de Glutathione Redutase 40U/mL. A placa foi lida no espectrofotômetro em 340nm por 3 minutos (20 em 20 segundos) a 37°C. Foi adicionado 20uL de t-BHP (Tert Butil Hidroperóxido 70% - Sigma Aldrich, St Luis, USA e água mili-Q). Em seguida foi lido novamente em 340nm por 6 minutos (15 em 15 segundos). A leitura decaiu até extinguir todo o NADPH da placa. A última leitura foi utilizada para o cálculo da atividade da GPx. Cálculo: A taxa de decréscimo da concentração de NADPH foi estimada, a partir de:

$$\text{umol NADPH/min/mg proteína} = \frac{(\text{ABS inicial} - \text{ABS final}) \times 0,2 \times 1000}{6,22 \times 0,67 \times \text{prot(mg)}}$$

$$6,22 \times 0,67 \times \text{prot(mg)}$$

Sendo que: $\Delta\text{Abs}_{1\text{ min}} = (\text{ABS inicial} - \text{ABS final}) - \text{delta de 1 minuto}$; 0,2 = vol final na placa; 1000 = para transformar em mg proteína; 6.22 = coeficiente $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; 0.67 = caminho óptico da placa com 200ul de vol final; proteína = mg de proteína contidas no volume colocado no poço

4.2.4 Relação Superóxido Dismutase e Catalase (SOD/CAT):

Para obter a relação entre a SOD e a CAT foi utilizado os valores finais do teste da Superóxido dismutase (USOD/mg de proteína) dividido pelo valores finais do teste da Catalase (UCAT/mg de proteína).

4.3 Técnica utilizada para avaliar o dano oxidativo em DNA (Teste do Cometa)

Para o teste do cometa as lâminas foram preparadas com uma camada de Agarose Normal Melting 1% em PBS e deixadas para secar em temperatura ambiente. O tecido pulmonar fresco de cada animal foi separado e macerado em 1000ul de 20mM de EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid - Sigma Aldrich, St Luis, USA) a 10% e DMSO (Dimetil Sulfoxide - Sigma Aldrich, St. Louis, USA), homogeneizado e colocado em gelo por 5 minutos. A homogeneização foi repetida e em seguida foram pipetados 70ul da suspensão com 600ul de Agarose Low Melting 0,8% na lâmina. Foi colocada uma lamínula sobre ela e levada a geladeira por 15 minutos. A lamínula foi retirada com cuidado e as lâminas foram colocadas em uma solução de Lise contendo NaCl (Sodium Chloride - Merck Chemicals, Darmstadt, Ge), EDTA

(Ethylenediaminetetraacetic Acid - Sigma Aldrich, St Luis, USA), Tris (Hydroxymetilaminometano - Merck Chemicals, Darmstadt, Ge), DMSO (Dimetil Sulfoxide - Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e Triton (Triton X-100 - Merck Chemicals, Darmstadt, Ge) por 24 horas, na geladeira.

Após esse tempo, foi retirado o excesso da solução das lâminas, e elas foram colocadas na cuba de eletroforese (que foi envolta com gelo), com a solução Tampão de Eletroforese contendo NaOH (Sodium Hydroxide), EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid - Sigma Aldrich, St Luis, USA) e H₂O destilada, e deixadas por 20 minutos. Logo após, foi iniciada a corrida da eletroforese, por 20 minutos, a 25V e 300mA.

As lâminas foram neutralizadas 3 vezes por 5 minutos na Solução de Neutralização contendo Tris (Hydroxymetilaminometano - Merck Chemicals, Darmstadt, Ge). Foram secas na estufa por duas horas a 37°C e posteriormente foram fixadas por 15min. na solução de Fixação contendo TCA (Trichloroacetic acid - Merck Chemicals, Darmstadt, Ge), ZnSO₄ (Zinc sulfat heptahydrate - Merck Chemicals, Darmstadt, Ge) e glicerina. Foram lavadas 2 vezes em um recipiente com água mili-Q por 1 minuto e secas overnight no escuro.

No terceiro dia, as lâminas foram coradas com uma solução contendo: Nitrato de Prata (AgNO₃ - Sigma Aldrich, St Luis, USA), NH₄NO₃ (Ammonium nitrate - Sigma Aldrich, St Luis, USA), Ácido tungstosílico (Merck Chemicals, Darmstadt, Ge) e formaldeído e em seguida revelada com solução de NaCO₃ (Sodium Carbonate - Merck Chemicals, Darmstadt, Ge) a 5%. As lâminas passaram por dois banhos com água mili-Q, de um minuto cada e um banho com a Solução de Finalização contendo ácido acético a 1% (Sigma Aldrich, St

Luis, USA) por 5 min. Novamente foram lavadas em água mili-Q. Todas as lâminas finalmente foram secas e observadas ao microscópio de luz.

As células lesadas foram identificadas pela presença de uma “cauda” similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA (Figura 6). Estes fragmentos se apresentam em diferentes tamanhos e estão associados ao núcleo. O tamanho da cauda em relação a cabeça é proporcional à dimensão do dano causado.

Figura 6. Células cometa. Representação do tecido pulmonar marcado pelo teste do cometa. Células com dano celular se assemelham a um cometa, sendo a cauda (B) formada pelos fragmentos de DNA. (A) cabeça.

4.4 Técnica utilizada para avaliar a peroxidação lipídica no tecido pulmonar - Teste de TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

Para o teste de TBARS foram utilizados 100mg do tecido pulmonar

homogeneizado em nitrogênio líquido, utilizando o almofariz de aço inoxidável e pistilo. Em seguida, foi re-suspendido em 1ml de KCL 1,15% contendo (Potassium Chloride - Sigma Aldrich, St Luis, USA e água), e colocados em microtubos. Depois foram acomodados em caixa de isopor com gelo e incubados em agitador gangorra por 60 minutos. Centrifugados a 10000 RPM a 4°C por 40 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, e guardado para o ensaio no dia seguinte, a -20°C.

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, separados em tubos de vidro e acomodados em estante. Foi feita a curva padrão de MDA 4 tubos de vidro e um 1 para o branco. Foi pipetado 100ul de SDS 8,1% (Lauryl Sulfate Sigma – 2,025g, H₂O – 25ml) em todos os tubos. A curva padrão de MDA* foi preparada com os pontos de: 300nM, 30nM, 3nM, 0,3nM e deixada no gelo. Foi pipetado 100ul da amostra e 100ul para cada ponto da curva. Foi adicionado 300ul de água destilada (no branco foi 400ul), 750ul de ácido acético 20% (Ácido acético – Sigma Aldrich, St Luis, USA, 20ml, H₂O – 80ml) e 750ul de TBA 0,8% (Thiobarbituric acid, Merck Chemicals, Darmstadt, Ge – 800mg, H₂O – 100ml) em todos os tubos. O tubo branco continha todos os reagentes, menos a amostra/curva. Os tubos foram deixados em banho-maria a 95°C de 45 a 60 minutos (os tubos foram tampados com bolinhas de gude para evitar a evaporação). Após esse período, o ponto mais alto da curva apresentou cor rosa. As amostras apresentaram turbidez, portanto foram deixadas em geladeira tampadas com papel filme até o dia seguinte, para precipitação. Foi transferida 200ul do conteúdo dos tubos de ensaio para uma placa de ELISA. A placa foi lida em 532 nm.

4.5 Biologia Molecular para análise da expressão gênica das enzimas óxido nítrico sintetases NOS1, NOS2 e NOS 3

4.5.1 Extração de RNA

As moléculas do RNA serão extraídas dos espécimes tumorais e controles pulmonares, criopreservados à -80°C , usando o reagente Trizol (Invitrogen Co.) de acordo com as instruções do fabricante, a partir de aproximadamente 10mg de tecido congelado. O tecido será macerado e colocado em um microtubo juntamente com 1ml de Trizol sendo homogeneizado por inversão. Após 10 minutos à temperatura ambiente será acrescentado 0,2ml de clorofórmio homogeneizando por inversão e a mistura será deixada a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida será realizada centrifugação a 12.000g por 20 minutos a 4°C , transferindo-se depois o sobrenadante para um tubo novo com 0,6 ml de álcool isopropílico. O material permanecerá a temperatura ambiente em repouso por 10 minutos e em seguida será centrifugado por 15 minutos a 12.000g e a 4°C . Após essa centrifugação o sobrenadante será descartado e o pellet resultante será lavado com 1ml de etanol 75% e centrifugado por 5 minutos a 7.500g a 4°C . O sobrenadante será descartado e os tubos ficarão escorrendo sobre papel absorvente até secar o pellet. Feito isso, será adicionada H_2O miliQ auto clavada tratada com DEPC na quantidade suficiente para diluir o pellet de RNA.

A integridade e qualidade do RNA extraído será controlada pelo aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

4.5.2 Reação da Transcrição Reversa (RT-PCR) para obtenção do cDNA

A síntese do cDNA será realizada a partir de 2µg do RNA total. Em um tubo para PCR será adicionado 1µl de oligo dT (primer que se anexa à cauda poli A do RNA), 2µl de RNA total, 1µl de dNTP (10 mM) e 9µl de água DEPC 0,01% autoclavada. As amostras serão mantidas no termociclador à 65°C por 5 minutos e, depois, à 4°C por 1 minuto. Serão adicionados, então, SF Buffer 5x (4µl), DDT 0,1 M (1µl), Super Script 3 RT (1µl), homogeneizados com a pipeta e incubado à 50°C por 30 minutos e à 70°C por 15 minutos. O cDNA será armazenado em freezer -80 °C.

4.5.3 Reação em cadeia de polimerização em tempo real (qRT – PCR)

A reação de RT-PCR em tempo real será realizada em um termociclador Step One Plus (Applied Biosystems) através da técnica de sonda TaqMan. Os primers para NOS1, NOS2 e NOS3 foram selecionados a partir do banco de dados da Applied Biosystems e são inventoriados e padronizados pela própria empresa. O ensaio de qRT-PCR com a sonda Taqman foi feito de acordo com as orientações do fabricante. A obtenção e a análise dos dados serão realizadas pelo software que acompanha o aparelho, criado pela Applied Biosystems.

4.6 Técnica imunohistoquímica para avaliar a expressão dos antígenos NOS1, NOS2 e NOS3 em células alveolares e bronquiolares.

Cortes de 3µm de espessura foram montados sobre lâminas silanizadas. As lâminas silanizadas foram desparafinadas em banho de 20 minutos em xilol aquecido a 95°C, seguido de três banhos de xilol à temperatura ambiente. Em seguida, o tecido foi hidratado, em álcool absoluto, álcool 95% e álcool 70%, e a seguir lavado em água corrente, água destilada e deionizada. O próximo passo foi a recuperação antigênica, que foi realizada em uma panela a vapor, na qual o “berço” com as lâminas em cuba com solução de citrato 10mM, pH 6,0 a 95-100°C foi colocado. Após 35 minutos, a cuba com as lâminas foi retirada e permaneceu mais 20 minutos em temperatura ambiente para esfriar. Então, foi realizada a etapa da lavagem em tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,2-7,4 (PBS) por três vezes, três minutos cada. Na sequência, se procedeu o bloqueio das peroxidases endógenas, lavando-se as lâminas em peróxido de hidrogênio 10V (3%), sete vezes por cinco minutos. Nesse momento, as lâminas foram lavadas três vezes em água corrente, três vezes em água destilada e mais três vezes em PBS, cada lavagem durando três minutos. O próximo passo foi o bloqueio de sítios inespecíficos, colocando-se as lâminas em leite desnatado 2% diluído em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram, em seguida, escurridas e deixadas para secar ao redor do corte. Os anticorpos primários, nas seguintes diluições, foram adicionados lentamente, cada um em uma lâmina pré - processada: NOS 1, NOS 2, NOS 3 diluição 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA). As

diluições foram feitas em soro de albumina bovina (BSA 0.5%), Sigma Diagnostics, St. Louis, USA). As lâminas foram cobertas com 100mL dessas soluções e permaneceram incubadas em câmara úmida em geladeira durante 18 horas. Após este período de incubação, as lâminas foram submetidas a lavagem novamente em PBS três vezes por três minutos e, em seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário LSAB-HRP (Large Streptavidin-Avidin-Biotin – System Peroxidase; k-0690; Dako A/S, Copenhagen, Denmark), conforme a seguinte seqüência de utilização: primeiramente foi incubado o anticorpo secundário por uma hora a 37°C, em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com estreptoavidina- biotinilada peroxidase por 45 minutos a 37°C. Após três banhos de três minutos em PBS, procedeu-se à revelação: as lâminas foram colocadas no cromógeno (3-3'-diaminobenzamida – DAB 100mg em 70mL de PBS + 3mL de água oxigenada; Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) por cinco minutos, lavadas em água corrente por mais cinco minutos, contracoradas em hematoxilina de Harris (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) por 30 segundos e novamente lavadas em água corrente por cinco minutos e, para serem desidratadas, foram submersas por três vezes em álcool 70%, três vezes em álcool 95%, três em álcool absoluto e mais três em solução de xilol. Para controles positivos, para cada anticorpo foram utilizados e processados simultaneamente aos casos. Para controle negativo, lâminas dos mesmos tecidos controles foram incubadas com BSA. Todas as lâminas finalmente foram montadas com lamínula e Entelan no montador de lâminas Leica modelo CV5030 (Leica Microsystems Nussloch, GmbH, Nussloch, Alemanha) e mantidas em posição horizontal por 24 horas. A reação pela técnica da imunoperoxidase foi considerada positiva

através da forte coloração marrom no citoplasma das células alveolares e bronquiolares.

4.7 Histomorfometria

Para determinar os índices expressos pela marcação imuno-histoquímica, foi utilizada a técnica do *point-counting*, através de um retículo contendo 100 pontos e cinquenta retas, segundo proposto em 2010 por HSIA e colaboradores (Hsia et al., 2010). Ao aumento de 400X, foram examinados dez campos microscópicos não-coincidentes, totalizando 1.000 pontos por lâmina, cobrindo uma área de 62.500µm². Para corrigir os dados, tendo em vista as diferenças de expansão do tecido pulmonar, fator que não pode ser controlado durante a feitura das mesmas, foram considerados os pontos que incidiam em septos alveolares. Os valores foram expressos em porcentagem de pontos positivos do total de pontos em áreas dos septos alveolares, segundo a formula:

$$P_{\text{PONTOS}} = (P_i \times 100) / P_{\text{septos alveolares}}$$

P_{PONTOS} é a porcentagem corrigida de pontos marcados, P_i é o número de pontos que incidem sobre a positividade do marcador imuno-histoquímico e $P_{\text{septosalveolares}}$ é o total de pontos que incidem sobre os septos alveolares. A P_{PONTOS} de cada antígeno em cada caso foi calculada a partir da soma dos resultados P_i e $P_{\text{PARÊNQUIMA}}$ de todos os campos analisados para cada.

Comparações da contagem de dois observadores (VLC, ERP) foram feitas aproximadamente em 20% dos casos em cada marcador imuno-histoquímico.

A análise quantitativa do grau de lesão celular foi realizada mediante a utilização de um analisador de imagem acoplado a um microscópio de luz. O sistema utilizado consiste de uma câmera Nikon (Digital Sight DS – Ri1) acoplada a um microscópio da mesma marca (Nikon Eclipse, 50 i), a partir do qual as imagens foram visualizadas no monitor. Através de um sistema digital inserido num computador (Pentium4 3000Mhz), as imagens foram processadas pelo *software* Image Pro-Plus-7.0 (Chicago, EUA). (Figura). Para a contagem dos cometas foram medidas a região da cabeça e cauda de cada célula, uma média de 10 células por campo totalizando 100 células por lâmina. O resultado final dos cometas for obtido dividindo o comprimento da cauda pela cabeça.

Figura 7. Aferição das medidas de cabeça e cauda dos cometas. Para avaliação do grau do dano no DNA a cabeça e a cauda dos cometas foram medidas mediante a utilização do software Image Pro Plus 7.0.

4.8 Tabulação dos dados e análise estatística

Todos os dados foram digitados em forma de tabela no programa Microsoft Office Excel 2007, a partir do qual foram organizados e tabulados em planilhas. De posse desses dados, foi feita a análise estatística. Todos os dados obtidos foram analisados mediante testes estatísticos para comparação, baseados nos tipos de distribuição das variáveis. As distribuições foram consideradas paramétricas, segundo o programa estatístico SPSS versão 10.0 (SPSS Inc; Illinois, USA).

Os valores obtidos pelos estudos de cada variável contínua foram organizados e descritos pela média e desvio padrão. Para a comparação entre as médias de duas populações amostrais foi utilizado o teste “*t*” de Student e para a comparação entre as médias de três ou mais populações foi feita mediante análise de variância pelo teste auxiliar de Bonferroni.

Para que se considere diferença entre médias e frequências tomamos o valor de significância estatística menor a 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Modelo Experimental de Carcinogênese

Após 2 meses, o exame macroscópico dos pulmões, assim como fígado, baço e rins dos animais iniciados com a uretana não evidenciou a presença de tumores. No entanto, a análise histológica dos lobos pulmonares confirma a presença de lesões neoplásicas em distribuição multicêntrica e com diâmetro não ultrapassando 0,2 mm.

A figura ilustra o parênquima pulmonar observado nos grupos controle e uretana. A Figura 8A (HE 200X) e 8B (HE 400X) representa o parênquima normal no grupo controle e a Figura 8C (HE 200X) e 8D (HE 400X) representa o parênquima pulmonar modificado pela presença de pequenos nódulos sub-pleurais após os 2 meses que receberam as duas doses de 1,5g/kg do carcinógeno uretana. Como se pode contemplar na Figura 8D, os nódulos são compostos por células epiteliais, redondas ou ovais, levemente pleomórficas, contendo núcleos hipercromáticos, citoplasma eosinofílico, e arranjo em pequenos ácinos. A contagem de mitoses atípicas fica entre 3 a 5/10 campos de grande aumento.

Figura 8. Histopatologia do tecido pulmonar. A iniciação de dá sob forma de nódulos contendo células epiteliais redondas ou cuboidais, núcleos atípicos, citoplasma amplo em arranjo acinar. Os pulmões foram removidos no 60° dia após, nos grupos controle e iniciados com uretana (1,5g/kg). É possível notar a densidade de células proliferadas (Figura 8C e 8D) em relação ao pulmão normal (Figura 8A e 8B). As figuras são representativas de cada grupo. H&E 200X (A e C) e 400X (C e D).

5.2 Atividade das Enzimas Antioxidantes

A Tabela 2 contém as médias $\pm$ DP e a Figura 9 ilustra as médias $\pm$ DP obtidas através da análise bioquímica do tecido pulmonar para verificação da atividade das enzimas antioxidantes nos grupos controle (C) e iniciado com uretana (U).

Tabela 4. Atividade das enzimas antioxidantes observadas no tecido pulmonar dos animais controles e dos iniciados.

Grupos	CAT	SOD	SOD/CAT	GPx
Controle	8,87±1,64	17,25±6,32	1,93±0,59	26,56±6,80
Uretana	12,88±1,66*	23,92±3,92	1,87±0,32	26,35±11,66

Camundongos Balb/C foram aleatoriamente separados em: 1) controle (C) e 2) iniciados com uretana (U). Todos os valores foram estimados Unidade por mg/proteína. Valores representam médias $\pm$ DP de 5 camundongos em cada grupo. * CAT: U vs C ($p=0,003$).

Figura 9. Pulmões controles e iniciados expressam atividades diferentes da atividade enzimática antioxidante. A atividade das enzimas foi calculada através de

teste bioquímico no tecido pulmonar e foi realizada 60 dias após, nos pulmões dos grupos controle (C) e iniciado com uretana (U). O gráfico em barras mostra o desvio padrão da atividade enzimática antioxidante entre os dois grupos. * CAT: U vs C ($p=0,003$).

Na Tabela 4 e na Figura 9 evidencia-se um aumento significativo da atividade da catalase nos pulmões dos animais iniciados com uretana em relação aos controles ($p=0,003$). Uma tendência estatística também foi verificada na atividade da superóxido dismutase dos animais iniciados ($p=0,07$).

5.2.1 Atividade das enzimas antioxidantes nos grupos Uretana e Suplementados.

A tabela 5 contém as médias e DP e as Figuras 10, 11, 12 e 13 ilustram os resultados obtidos no grupo uretana (U) e nos grupos suplementados.

Tabela 5: Atividade das enzimas antioxidantes observadas no tecido pulmonar dos animais iniciados e tratados.

Grupos	CAT	SOD	SOD/CAT	GPx
U	12,88±1,66	23,92±3,92	1,87±0,32	26,35±11,66
U+O	11,65±4,27	30,38±12,32	2,70±0,94	25,93±9,04
U+E	11,00±2,75	24,05±4,72	2,23±0,40	19,80±6,61
U+B	11,90±4,47	21,08±7,42	1,83±0,51	24,29±11,77

Camundongos Balb/C foram randomicamente separados em 1) iniciados com uretana (U), 2) suplementados com extrato (U+E), 3) suplementados com óleo (U+O) e 4) suplementados com betacaroteno (U+B). Todos os valores foram estimados em Unidade por mg/proteína. Valores representam médias $\pm$ DP de 5 camundongos em cada grupo.

A análise da Tabela 5 e da Figura 10 mostra que não houve alteração significativa da atividade da catalase nos grupos iniciados e tratados.

Figura 10. Pulmões iniciados e suplementados expressam atividade semelhante da enzima antioxidante catalase. A atividade das enzimas foi calculada através de teste bioquímico no tecido pulmonar e foi realizada 60 dias após, nos pulmões dos grupos iniciados (U) e suplementados com óleo (U+O), com extrato (U+E) e betacaroteno (U+B). O gráfico em barras mostra os valores com desvio padrão da atividade enzimática antioxidante da catalase entre os grupos.

Figura 11. Pulmões iniciados e suplementados expressam atividade semelhante da enzima antioxidante superóxido dismutase. A atividade das enzimas foi calculada através de teste bioquímico no tecido pulmonar e foi realizada 60 dias após, nos pulmões dos grupos iniciados (U) e suplementados com óleo (U+O), com extrato (U+E) e betacaroteno (U+B). O gráfico em barras mostra o desvio padrão da atividade enzimática antioxidante da superóxido dismutase entre os grupos.

A Tabela 5 e Figura 12 mostra que não houve alteração significativa da atividade da superóxido dismutase nos grupos iniciados e tratados.

Figura 12. Pulmões iniciados e suplementados expressam relações diferentes entre a atividade da enzima superóxido dismutase e catalase. A relação entre as duas enzimas foi obtida através dos valores representativos de sua atividade no tecido pulmonar e foi realizada 60 dias após, nos pulmões dos grupos iniciados (U) e suplementados com óleo (U+O), com extrato (U+E) e betacaroteno (U+B). O gráfico em barras mostra o desvio padrão da relação entre a SOD/CAT entre os grupos. * U+O vs U+B ($p < 0,05$).

A Tabela 3 e a Figura 12 demonstra uma alteração significativa da relação SOD/CAT entre o grupo uretana e o grupo tratado com extrato ($p < 0,05$).

Figura 13. Pulmões iniciados e suplementados expressam atividade semelhante da enzima antioxidante glutathione peroxidase. A atividade das enzimas foi calculada através de teste bioquímico no tecido pulmonar e foi realizada 60 dias após, nos pulmões dos grupos iniciados (U) e suplementados com óleo (U+O), com extrato (U+E) e betacaroteno (U+B). O gráfico em barras mostra o desvio padrão da atividade enzimática antioxidante da glutathione peroxidase entre os grupos.

A Tabela 5 e Figura 13 mostram que não houve alteração significativa da atividade da glutathione peroxidase nos grupos uretana e tratados.

5.3 Dano Oxidativo no DNA

A Tabela 6 contém as médias $\pm$ DP e a Figura 14 ilustra as médias $\pm$ DP obtidas pela quantificação do dano ao DNA através da morfometria do cometa nos grupos controle (C) e iniciado com uretana (U).

Tabela 6. Grau de dano em DNA verificado nas células respiratórias pelo teste do cometa.

Grupos	Dano do DNA
Controle	1,43±0,23
Uretana	3,36±0,35*

Grau de dano em DNA verificado nas células respiratórias pela relação cauda/cabeça obtida através das medidas dos cometas verificadas nos pulmões dos animais controles e dos iniciados. Camundongos Balb/C foram randomicamente separados em: 1) controle (C) e 2) iniciados com uretana (U). Todos os valores foram estimados em 100 cometas randômicos, por lâmina, não coincidentes por animal. Valores representam médias $\pm$ DP de 5 camundongos em cada grupo. * U vs C ($p < 0,0001$).

Figura 14. Pulmões controles e iniciados com uretana apresentam diferentes graus de dano oxidativo no DNA. Pulmões controles e iniciados expressam

diferentes graus de dano oxidativo no DNA. A relação cauda/cabeça obtida através das medidas dos cometas que foi realizada 60 dias após, nos pulmões dos grupos controle (C) e iniciado com uretana (U). O gráfico de barras mostra o desvio padrão da relação cauda/cabeça dos cometas em cada grupo. * U vs C ($p < 0,0001$).

Figura 15. Células cometa no grupo controle e iniciado com uretana. A figura ilustra o grau de dano no DNA verificado nas células do tecido pulmonar dos dois grupos estudados. O grau de dano do DNA é mostrado pelo comprimento maior da cauda em relação à cabeça no grupo controle (A, setas) e grupo uretana (B, setas). Teste do cometa, controle (A) e uretana (B), 200x.

Analisando a Tabela 6 e a Figura 14 nota-se uma significativa maior relação entre cauda/cabeça nas células dos pulmões dos animais iniciados com uretana em relação ao controle ($p < 0,0001$).

5.3.1 Dano Oxidativo no DNA de Animais Iniciados e Suplementados

A Tabela 7 contém as médias e DP e as Figuras 16 e 17 ilustram os resultados obtidos no grupo uretana (U) e nos grupos suplementados.

Tabela 7. Média e DP da relação cauda/cabeça nas células pulmonares dos animais iniciados e suplementados.

Grupos	Dano do DNA (Média ± DP)
U	3,36±0,35
U+O	2,19±0,09*
U+E	2,16±0,60*
U+B	1,90±0,30*

Camundongos Balb/C foram randomicamente separados em 1) iniciados com uretana (U), 2) suplementados com óleo (U+O), 3) suplementados com extrato (U+E) e 4) suplementados com betacaroteno (U+B). Todos os valores foram randomicamente estimados em 10 campos randômicos, não coincidentes por animal. Valores representam médias ± DP de 10 camundongos em cada grupo. * U vs U+E, U+O e U+B ($p < 0,001$).

Figura 16. Pulmões iniciados e suplementados expressam diferentes graus de dano oxidativo no DNA. A relação cauda/cabeça obtida através das medidas dos cometas que foi realizada 60 dias após, nos pulmões dos grupos iniciados (U) e suplementados com óleo (U+O), com extrato (U+E) e betacaroteno (U+B). O gráfico de barras mostra o desvio padrão da relação cauda/cabeça dos cometas em cada grupo. U vs U+O, U vs U+E e U vs U+B ($p < 0,0001$).

Figura 17. Dano em DNA no tecido pulmonar dos camundongos iniciados com uretana e suplementados. A Figura 17A representa o tecido pulmonar dos animais iniciados (U), e as Figuras 17B representa o dano em DNA verificado no grupo iniciado e suplementado com o óleo, a Figura 17C representa o dano celular verificado nos animais suplementados com extrato e a Figura 17D representa o dano verificado nos animais suplementados com betacaroteno. Nota-se evidente redução da cauda dos cometas e por conseguinte do dano em DNA nos grupo suplementados com óleo e betacaroteno. Teste do cometa, uretana (A), suplementado com óleo (B), suplementado com extrato (C), suplementado com betacaroteno (D) 200X.

Na Tabela 7 e a Figura 17 evidencia-se uma significativa menor relação entre cauda/cabeça dos cometas observados nos pulmões dos animais tratados em relação aos iniciados ($p < 0,0001$).

5.4 Avaliação da Peroxidação Lipídica

A Tabela 8 contém as médias $\pm$ DP e a Figura 18 ilustra as médias $\pm$ DP obtidas através da análise bioquímica do tecido pulmonar para verificação da peroxidação lipídica nos grupos controle (C) e iniciado com uretana (U).

Tabela 8. Níveis de peroxidação lipídica observadas no tecido pulmonar dos animais controles e dos iniciados.

Grupos	TBARS
Controle	4,08 $\pm$ 0,71
Uretana	6,65 $\pm$ 2,36

Camundongos Balb/C foram randomicamente separados em: 1) controle (C) e 2) iniciados com uretana (U). Todos os valores foram estimados em nMol/mg de proteína. Valores representam médias $\pm$ DP de 5 camundongos em cada grupo. *U vs C (p=0,06).

Figura 18. Pulmões controles e iniciados expressam diferentes graus de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica foi obtida através do teste bioquímico de TBARS realizada 60 dias após, nos pulmões dos grupos controle (C) e iniciado com uretana (U). O gráfico de barras mostra os níveis de peroxidação lipídica em cada grupo.

Observou-se que os animais iniciados apresentaram uma maior peroxidação lipídica em relação ao controle, sendo essa diferença marginalmente significativa ($p=0,06$).

5.4.1 Avaliação da Peroxidação Lipídica nos Animais Iniciados e Suplementados.

A tabela 9 contém as médias e DP e a Figura 19 ilustra os resultados obtidos no grupo uretana (U) e nos grupos tratados.

Tabela 9. Pulmões iniciados e suplementados expressam diferentes graus de peroxidação lipídica.

Grupos	TBARS
U	6,65±2,36
U+O	4,24±1,17*
U+E	3,77±0,86*
U+B	4,08±1,01*

A peroxidação lipídica foi obtida através do teste bioquímico de TBARS sendo realizada 60 dias após, nos pulmões dos grupos iniciados (U), suplementados com óleo (U+O), com extrato (U+E) e betacaroteno (U+B). * $p < 0,05$ em relação ao grupo U.

Figura 19. Pulmões iniciados e suplementados expressam diferentes graus de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica foi obtida através do teste bioquímico de

TBARS sendo realizada 60 dias após, nos pulmões dos grupos iniciados (U) e suplementados com óleo (U+O), com extrato (U+E) e betacaroteno (U+B). O gráfico em barras mostra os níveis de peroxidação lipídica em cada grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo U.

A Tabela 9 e Figura 19 mostram que houve uma diminuição estatisticamente significativa da peroxidação lipídica observada nos grupos suplementados com extrato, óleo e betacaroteno em relação aos iniciados ($p < 0.05$).

5.5. Expressão gênica das enzimas óxido nítrico sintetase NOS 1, NOS 2 e NOS 3 no tecido pulmonar

5.5.1 Expressão gênica das NOS1,2 e 3 nos grupos controle e iniciado.

A Tabela 10 contém as médias e desvio padrão (DP) da expressão gênica das NOS nos grupos controle (C) e iniciado com uretana (U).

Tabela 10. Quantificação relativa da expressão gênica observada no tecido pulmonar dos animais controles e dos iniciados.

Grupos	NOS 1	NOS 2	NOS 3
Controle	1688 ± 1400	180,4 ± 154,9	5,38 ± 2,69*
Uretana	2052 ± 2268	447 ± 372,4	25,91 ± 19,93*

Camundongos Balb/C foram randomicamente separados em: 1) controle (C) e 2) iniciados com uretana (U). Valores representam médias $\pm$ DP de 5 camundongos em cada grupo. * U vs C ($p < 0,05$).

Figura 20. Pulmões controles e iniciados apresentam diferente expressão gênica das isoformas da NOS. A expressão gênica das óxido nítrico sintases NOS1, NOS2 e NOS foi realizada no tecido pulmonar de camundongos balb/C dos grupos controle (C) e iniciados (U). O gráfico em barras mostra a quantificação relativa da expressão gênica das isoformas da NOS nos dois grupos. *U vs C ($p < 0,05$).

Analisando a Tabela 10 e a Figura 20 nota-se uma significativa maior expressão gênica da NOS3 no grupo iniciado em relação aos controle. ($p < 0,05$). A expressão gênica da NOS1 e NOS2 no grupo iniciado foi maior em relação ao controle, embora essa relação não tenha sido significativa.

A tabela 11 contém as médias e DP e as Figuras 21, 22 e 23 ilustram os resultados obtidos no grupo uretana (U) e nos grupos tratados.

Tabela 11. Média e DP da quantificação relativa da expressão gênica das óxido nítrico sintases observada no tecido pulmonar dos animais iniciados e suplementados.

Grupos	Média ± DP NOS 1	Média ± DP NOS 2	Média ± DP NOS 3
U	1717 ± 2102	447 ± 372,2	23,27 ± 20,25
U+O	3769 ± 6966	33,77 ± 41,26*	8,62 ± 3,86 [#]
U+E	3888 ± 406,5	52,16 ± 57,75*	9,94 ± 4,88
U+B	1122 ± 1250	45,36 ± 68,07*	9,46 ± 2,77 [#]

Camundongos Balb/C foram randomicamente separados em 1) iniciados com uretana (U), 2) tratados com extrato (U+E), 3) tratados com óleo (U+O) e 4) tratados com betacaroteno (U+B). Valores representam médias ± DP de 10 camundongos em cada grupo. * U vs U+O, U+E e U+B ($p < 0,05$), [#] U vs U+O e U+B ($p < 0,05$).

Figura 21. Expressão gênica da NOS1 nos pulmões iniciados e suplementados.

A expressão gênica da óxido nítrico sintase NOS1 foi realizada no tecido pulmonar de camundongos balb/C dos grupos iniciados (U) e suplementados com óleo (U+O), com extrato (U+E) e betacaroteno (U+B). O gráfico em barras mostra a quantificação relativa da expressão gênica da NOS1 nos animais iniciados e suplementados.

A Tabela 11 e a Figura 21 mostra que não houve uma expressão gênica significativa da NOS1 entre o grupo iniciado e os grupos suplementados.

Figura 22. Animais iniciados e suplementados apresentam diferente expressão gênica da NOS2. A análise da quantificação relativa da expressão gênica da enzima

óxido nítrico sintase NOS2 foi realizado no tecido pulmonar dos grupos iniciados (U) e suplementados com óleo (U+O), com extrato (U+E) e betacaroteno (U+B), após 60 dias de tratamento. O gráfico de barras mostra a quantificação relativa da expressão gênica da NOS2 em cada grupo. * U vs U+O, U+E e U+B ($p<0,05$).

A Tabela 11 e a Figura 22 mostra que a expressão gênica da NOS2 nos grupos tratados esta significativamente diminuída em relação aos iniciados ($p<0,05$).

Figura 23. Animais iniciados e suplementados apresentam diferente expressão gênica da NOS3. A análise da expressão gênica da óxido nítrico sintase NOS3 foi realizada no tecido pulmonar de camundongos balb/C dos grupos iniciados (U) e dos grupos que foram suplementados por 60 dias com óleo (U+O), com extrato (U+E) e betacaroteno (U+B). O gráfico em barras mostra a quantificação relativa da expressão gênica da NOS3 nos animais estudados. * U vs U+O e U+B ($p<0,05$).

A Tabela 11 e a Figura 23 mostra uma expressão gênica da NOS3 significativamente diminuída nos animais suplementados com óleo e betacaroteno em relação aos animais iniciados ($p < 0,05$). Os animais suplementados com extrato apresentaram uma menor expressão gênica da NOS3 quando comparados com os iniciados, sendo essa expressão marginalmente significativa ($p = 0,06$).

5.6 Imunoexpressão das enzimas óxido nítrico sintetase NOS 1, NOS 2 e NOS 3 no tecido pulmonar

5.6.1 Imunoexpressão das NOS1,2 e 3 no grupo controle e iniciado.

A Tabela 12 contém as médias e desvio padrão (DP) das porcentagens de células alveolares septais com imunoexpressão das NOS nos grupos controle (C) e iniciado com uretana (U).

Tabela 12. Porcentagem de área ocupada pelas células alveolares septais com imunoexpressão de NOS nos pulmões de animais controles e uretana.

Grupos	NOS 1	NOS 2	NOS 3
Controle	20,74 ± 4,11	17,17 ± 0,74	14,95 ± 3,38
Uretana	42,16 ± 1,98*	53,44 ± 5,09*	50,92 ± 3,29*

Camundongos Balb/C foram randomicamente separados em: 1) controle e 2) uretana (1,5g/kg). Todos os valores foram estimados em 10 campos randômicos, não coincidentes por animal. Valores representam médias $\pm$ DP de 5 camundongos em cada grupo. * NOS 1 vs NOS 2 vs NOS 3 ($p=0,0001$).

De acordo com a Tabela 12 e Figuras 24 e 28, pulmões controles e sob ação da uretana expressaram frações diferentes das isoformas NOS1, NOS2 e NOS3. Houve expressão significativamente menor das NOS no tecido pulmonar dos animais controle quando comparados aos animais sob ação da uretana ($p<0,0001$) (Figura 20).

Figura 24. Pulmões controles (C) e uretana (U) expressam frações diferentes de isoformas das NOS. A quantificação da imunoexpressão das NOS foi realizada 60 dias após a indução, nos pulmões controle e uretana (1,5g/kg). O gráfico de barras

mostra o desvio padrão das NOS em cada grupo. * NOS1 vs NOS2 vs NOS3 ($p < 0,0001$).

5.6.2 Imunoexpressão das NOS1, 2 e 3 nos grupos Iniciados e suplementados.

A tabela 13 contém as médias e DP e as Figuras 25,26,27 e 28 ilustram a expressão protéica das isoformas da NOS obtidas no grupo uretana (U) e nos grupos suplementados.

Tabela 13. Fração de área ocupada pelas células alveolares septais com imunoexpressão de NOS nos pulmões de animais com uretana e suplementados.

Grupos	NOS 1	NOS 2	NOS 3
U	42,16 ± 1,98*	53,44 ± 5,09*	50,92 ± 3,29*
U+O	33,03 ± 3,57	17,40 ± 2,67	13,80 ± 1,50
U+E	29,67 ± 3,69	16,31 ± 2,97	19,41 ± 2,57
U+B	22,63 ± 7,00	37,33 ± 14,07	10,27 ± 2,42#

Camundongos Balb/C foram randomicamente separados em: 1) uretana (U), 2) tratados com extrato (U+E), 3) tratados com óleo (U+O) e 4) suplementados com betacaroteno (U+B). Todos os valores foram randomicamente estimados em 10 campos randômicos, não coincidentes por animal. Valores representam médias ± DP de 10 camundongos em cada grupo.

* U+O, U+B e U+E vs U ($p < 0,001$). # U+B em relação ao U+E e U+O ($p < 0,05$).

Figura 25. Pulmões iniciados com uretana e suplementados imuno-expressam frações diferentes de isoformas das NOS 1. A quantificação da imunoexpressão das NOS foi realizada 60 dias após a iniciação dos pulmões dos grupos com uretana (1,5g/kg) e separados em: 1) iniciados com uretana (U), 2) suplementados com extrato (U+E), 3) suplementados com óleo (U+O) e 4) suplementados com betacaroteno (U+B). O gráfico de barras mostra o desvio padrão da NOS1 em cada grupo. * U+O, U+B e U+E vs U ($p<0,001$). # U+B em relação ao U+E e U+O ($p<0,05$).

Analisando a Tabela 13 e a Figura 25 e 28, verifica-se uma diminuição significativa da expressão da NOS1 nos grupos suplementados com o óleo, o extrato e o betacaroteno em relação ao grupo uretana ($p<0,001$). Também se observa uma expressão significativamente menor da NOS 1 no grupo suplementado com betacaroteno em relação aos grupos suplementados com o óleo e o extrato ($p<0,05$).

Figura 26. Pulmões iniciados e suplementados imunoexpressam frações diferentes de isoformas das NOS 2. Imunoexpressão da NOS 2 nos grupos iniciados (U) e suplementados com óleo (U+O), com extrato (U+E) e betacaroteno (U+B). O gráfico de barras mostra o desvio padrão da NOS2 em cada grupo. * U vs U+O, U+E e U+B ($p<0,0001$), # U+B vs U+O e U+E ($p<0,05$).

Vislumbra-se na Tabela 13 e Figura 26 e 28 uma diminuição significativa da expressão da NOS 2 nos grupos suplementados com o óleo, o extrato e o betacaroteno em relação ao grupo uretana ($p<0,0001$). Igualmente significativa é a maior expressão da NOS 2 no grupo suplementado com betacaroteno quando comparado aos grupos suplementados com óleo e extrato do pequi ($p<0,05$).

Figura 27. Pulmões iniciados e suplementados imunoexpressam frações diferentes de isoformas das NOS 3. Imunoexpressão da NOS 3 nos grupos iniciados (U) e suplementados com óleo (U+O), com extrato (U+E) e betacaroteno (U+B). O gráfico de barras mostra o desvio padrão da NOS3 em cada grupo. * U vs U+O, U+B e U+E ($p<0,001$); # U+B vs U+O e U+E ($p<0,001$); δ U+E vs U+O ($p<0,001$).

A Tabela 13 e a Figura 27 e 28 mostra uma diminuição significativa da expressão da NOS3 nos grupos tratados em relação ao grupo uretana ($p<0,001$). Nota-se também significativa diminuição na expressão da NOS 3 no grupo suplementado com betacaroteno em relação aos suplementados com óleo e extrato de pequi ($p<0,001$). Igualmente significativa é a menor expressão na NOS 3 no grupo uretana em relação ao grupo suplementado com o óleo ($p<0,001$).

Figura 28. Marcações imuno-histoquímicas para NOS 1; NOS 2 e NOS 3.

Observamos uma importante diminuição da expressão das isoformas das NOS nos grupos iniciados com uretana e suplementados com óleo (G,H,I), extrato (J,K,L) e betacaroteno (M,N,O) quando comparados ao grupo que só recebeu as doses de uretana (D,E,F). Imunohistoquímica para NOS1 ,NOS2 e NOS3 (400x).

6. DISCUSSÃO

O uso de antioxidantes alimentares tem ganhado uma crescente popularidade nos últimos anos. O pequi é uma fruta com altas concentrações de antioxidantes como a vitamina E, carotenóides e compostos fenólicos. Sabe-se que tais compostos antioxidantes exercem ações importantes contra algumas doenças resultantes do acúmulo de danos oxidativos (Miranda-Vilela et al., 2008; Khouri et al., 2010; Miranda-Vilela et al., 2010; Miranda-Vilela et al., 2009).

Possíveis estratégias para a prevenção de câncer têm sido muito estudadas atualmente e a quimioprevenção através da utilização de compostos naturais como o pequi, que não apresentem efeitos colaterais ou impactos negativos para a saúde indivíduo têm ganhado um acentuado destaque (Halliwell, 2000; Cooke et al., 2000).

A uretana ou carbamato de etila (EC) é um carcinógeno químico presente nas folhas de tabaco, cigarros e produtos alimentares processados como pão, queijo e iogurte (Sakano et al., 2002) formados pela reação da uréia com álcool (Zimmerli et al., 1991).

Em roedores, mais de 90% das doses administradas de uretana são hidrolisadas em álcool, amônia e dióxido de carbono no fígado pelas enzimas microssomais (Zimmerli et al., 1991, Sakano et al., 2002). Aproximadamente 0.1% da uretana é convertido pelo citocromo p450 em N-hidroxiuretana e menos de 0,5% em carbamato de vinil sendo esta última capaz de formar adutos de DNA in vivo (Sakano et al., 2002; Beremblum et al., 1959; Zimmerli et al., 1991; Andrade-Sobrinho et al., 2002).

Os resultados de uma série de ensaios bioquímicos sugerem que a atividade antioxidante do *Caryocar brasiliense* Camb pode ter desempenhado um papel importante na redução dos efeitos dessa substância cancerígena genotóxica.

Em nosso estudo foi observado que a suplementação com óleo e extrato de pequi por sessenta dias consecutivos foi capaz de prevenir o dano no DNA, a peroxidação lipídica e o aumento na expressão protéica e gênica das isoformas da NOS (NOS1,2,3) na carcinogênese pulmonar induzida por uretana em camundongos.

Estudos em modelo experimental com bleomicina e ciclofosfamida mostram que o dano oxidativo celular pode ser minimizado com o uso de extrato e óleo de pequi sugerindo que esta ação seja devido ao alto teor de antioxidantes presentes na fruta (Miranda-Vilela et al., 2008). Nossos resultados mostram que o pequi parece ter efeitos protetores contra a toxicidade pulmonar causada pela uretana, talvez por inibir o aumento de espécies reativas que contribuem para a ação genotóxica desse composto.

O sistema imunológico debilitado, assim como o ataque oxidativo aos vários componentes celulares pelos EROs é um fenômeno comum na patogênese das doenças neoplásicas (Khoury et al, 2007; Miranda-Vilela et al, 2009). A peroxidação lipídica medida pela MDA também foi diminuída pelo extrato e óleo do pequi, que são ricos em carotenóides e compostos fenólicos, o que sugere que o mesmo seja eficaz na prevenção da formação de EROs pela toxicidade da uretana.

A peroxidação lipídica consiste num processo de reações em cadeia causada por vários tipos de espécie reativa que leva à lesões oxidativas em

células e tecidos. Existe um grande número de estudos que mostram que os carotenóides podem atuar na proteção da célula contra radicais livres e sequestrar espécies reativas de oxigênio devido à presença de ligações duplas e conjugadas em sua estrutura, o que pode explicar o resultado obtido nos animais que foram suplementados com o pequi (Edge et al., 1997; Krinsky, 1994; Krinsky, 2001).

Os antioxidantes, como os compostos fenólicos, são capazes de modular o sistema imunológico através da redução da peroxidação lipídica e da produção de prostaglandina E2 nas células imunológicas. A síntese da prostaglandina E2 está faz parte de eventos inflamatórios e oxidativos, e é precedida da peroxidação do ácido araquidônico (Roll, 2013).

Alguns estudos especulam que NO• derivados de células pulmonares tem um papel importante na neovascularização tumoral, edema e permeabilidade vascular (Asano et al., 1994). Todas as três formas da NOS são capazes de sintetizar o NO• que reage com o O₂•- e forma ONOO- levando ao estresse oxidativo e ao dano celular. Altos níveis de atividade das NOS foram correlacionados com alguns tipos de câncer de pulmão como no caso dos adenocarcinomas (Fujimoto et al., 1997).

Os nossos resultados mostraram um aumento das isoformas da NOS no grupo com uretana em concordância com trabalhos anteriores porém observamos uma importante diminuição das três isoformas nos grupos tratados tanto com o extrato como com o óleo de pequi.

A presença dos compostos fenólicos na composição do pequi potencializa a sua ação antioxidante e anti-inflamatória. A uretana leva a inflamação crônica pelo aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias,

tais como IL - 1b e IL-6 com subsequente ativação e aumento da expressão do NF-kB e Stat 3, criando um microambiente propício para o desenvolvimento do tumor. Foi demonstrado que os compostos fenólicos evitam ou minimizam o estresse oxidativo, dano ao DNA e a ativação constitutiva de NF- kB e Stat3, importantes vias de sinalização de carcinogênese (Narayan e Kumar, 2013).

Outro estudo recente mostrou que alguns flavonóides, como a silibinina, podem diminuir a ação da NOS mediante a inibição de várias citocinas induzidas por vias de sinalização que regulam sua expressão (Ramasamy, et al 2010). Este flavonóide também tem a característica de inibir a toxicidade sistêmica da uretana inibindo a ativação da Stat-3 e NF-kB e múltiplas vias de indução de carcinogênese pulmonar por uretana (Ramasamy, et al 2010; Murakami, 2008). A redução das isoformas da NOS no caso do óleo e extrato de pequi pode ter uma via similar que a silibinina por também apresentar na sua composição compostos fenólicos semelhantes.

Há evidências para o papel dos antioxidantes na proteção contra o carcinógeno genotóxico uretana (Kemper et al., 1995). As enzimas antioxidantes exercem uma ação fundamental na diminuição do estresse oxidativo, isso porque elas fazem parte do principal mecanismo de defesa da célula contra os EROs . No entanto, nosso estudo mostrou um aumento que a uretana induziu uma atividade aumentada de algumas enzimas antioxidantes. A superóxido dismutase e a glutatona peroxidase protegem contra a toxicidade das quinonas reduzindo a geração de ROS das reações redox, é considerado uma importante via de detoxificação. A exposição a genotoxinas e/ou radiações resulta na produção ao longo tempo de ROS e radicais livres e o

comprometimento do sistema antioxidante (Dinkova-Kostova et al., 1995; Halliwell & Gutteridge, 1999). A modulação da capacidade antioxidante exógena com o óleo de pequi e o extrato poderia resultar na proteção contra os danos oxidativos induzidos. No que diz respeito ao aumento de catalase e superóxido dismutase nos animais iniciados com uretana, entendemos este achado como uma resposta inicial ao insulto oxidativo, uma vez que o estado oxidativo pode regular a expressão gênica e a atividade dessas enzimas (Valko et al., 2006, Rizvi & Maurya, 2007; Rahman, 2007). Este pode ser decorrente de um mecanismo compensatório para prevenir o dano oxidativo (Rahman, 2007).

No entanto, este aumento provavelmente não foi o suficiente para inibir ou diminuir o estresse oxidativo causado pela uretana, já que neste grupo o dano oxidativo estava aumentado. Por outro lado, os animais que foram tratados com o pequi tiveram seu dano oxidativo diminuído; tal fato nos leva a acreditar que o real impacto na diminuição do estresse oxidativo nesse modelo experimental de carcinogênese foram os antioxidantes exógenos provenientes do pequi.

O betacaroteno é um dos antioxidantes mais estudados na prevenção do câncer (Stahl e Sies, 1993; Edge et al., 1997; IARC, 1998). Alguns estudos atribuem a ele uma ação anti-carcinogênica e anti-mutagênica (Silva e Naves, 2001)

Estudos epidemiológicos observacionais e de estudo em modelos animais evidenciaram que em indivíduos saudáveis, o betacaroteno parece exercer um efeito protetor contra alguns tipos de câncer; prevenindo o estresse oxidativo, principalmente se ingerido em quantidades mais próximas das

fisiológicas ou por meio da alimentação através de uma dieta rica em frutas e verduras (Cerqueira et al., 2007; Silva e Naves, 2001; Block e Langseth, 1994).

Em nosso estudo o betacaroteno também demonstrou uma importante ação na diminuição do dano oxidativo do DNA e da peroxidação lipídica. Embora exista muita controvérsia na utilização dos antioxidantes isolados e sua contribuição para o aumento do estresse oxidativo, verificamos que o betacaroteno apresenta atividade semelhante aos compostos antioxidantes presentes no óleo e no extrato de pequi e acreditamos que tal resultado se deva principalmente à dose utilizada. Um resultado semelhante ao nosso foi verificado por Saad, 2006 onde foi demonstrado que o betacaroteno apresenta efeito quimiopreventivo sobre a incidência tumoral e a multiplicidade de lesões oxidativas causadas pela uretana somente quando administrados em doses próximas às fisiológicas (Saad, 2006; Martins et al., 2002)

No entanto, dois grandes estudos mostraram que altas doses deste carotenóide pode ter uma ação pró-oxidante levando a um aumento do dano celular e do risco do desenvolvimento de câncer pulmão em pacientes fumantes (Omenn et al, 1996; Paolini et al., 2001; Palozza et al., 2003). A sua utilização clínica desde então tem sido reduzido devido a esses estudos controversos, que apontam para o envolvimento dos oxidantes originados da fumaça do cigarro com a auto-oxidação do betacaroteno, o que aparentemente promove maior dano celular (ATBC, 1994; Albanes et al., 1996; Omenn et al., 1996).

Em que pese a importância os resultados obtidos, algumas limitações do estudo merecem ser comentadas. A primeira dela diz respeito à não realização de testes para a determinação dos componentes do pequi e suas respectivas

proporções, o que por outro lado abre perspectivas para o próximo estudo. Outra limitação diz respeito à não realização da análise da formação do peroxinitrito, o que poderia esclarecer de maneira mais específica a atuação das NOS's.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem considerar as seguintes conclusões:

- O óleo e o extrato do Pequi, fruta nativa do cerrado brasileiro, podem exercer um efeito protetor significativo no dano oxidativo induzido pela uretana;
- Os ensaios bioquímicos realizados sugerem que a atividade antioxidante do *Caryocar brasiliense* Camb tenha exercido um importante papel redutor dos efeitos genotóxicos do carcinógeno uretana;
- A suplementação dos animais com o óleo e extrato da fruta podem inibir o dano oxidativo em DNA e a peroxidação lipídica e diminuir a expressão gênica e protéica das isoformas das NOS's;
- A uretana também induz ao aumento da atividade de algumas enzimas antioxidantes, como a SOD e a CAT, provavelmente como mecanismo compensatório ao insulto oxidativo; no entanto esse aumento não foi suficiente para prevenir os efeitos deletérios causados pelas espécies reativas, já que esse grupo apresentou maior dano oxidativo quando comparado aqueles que receberam a suplementação de antioxidantes exógenos,
- Os efeitos modulatórios observados com o pequi confirmam os efeitos antioxidantes dos seus fitoquímicos preventivos;
- Mais estudos precisam ser realizados para confirmar o efeito protetor do Pequi, incluindo testes para determinar adequadamente a sua composição de antioxidantes;

- Estudos prospectivos tanto experimentais como em humanos ainda são necessários para validar os nossos resultados.

8. ANEXOS

ANEXO 1: Tabulação dos Dados Obtidos

1. a) Dosagem de Proteína das amostras de tecido pulmonar para o teste de TBARS.

Amostras	Valores	Resultados	Ptn
GC	0,28	0,2	2
GC	0,215	0,132	1,32
GC	0,258	0,177	1,77
GC	0,071	*	0
GC	0,549	0,479	4,79
GC	0,017		0
GC	*	*	*
GU	0,358	0,281	2,81
GU	0,483	0,411	4,11
GU	0,41	0,334	3,34
GU	0,167	0,082	0,82
GU	0,152	0,067	0,67
U+B	0,183	0,098	0,98
U+B	0,39	0,313	3,13
U+B	0,258	0,176	1,76
U+B	0,272	0,191	1,91
U+B	0,454	0,38	3,8
U+B	0,003	-0,089	-0,89
U+B	0,267	0,186	1,86
U+B	0,371	0,295	2,95
U+B	0,362	0,285	2,85

U+E	0,513	0,442	4,42
U+E	0,321	0,242	2,42
U+E	0,481	0,409	4,09
U+E	0,429	0,354	3,54
U+E	0,532	0,462	4,62
U+E	0,379	0,303	3,03
U+E	0,171	0,086	0,86
U+E	0,098	0,01	0,1
U+O	0,169	0,084	0,84
U+O	0,208	0,125	1,25
U+O	0,397	0,321	3,21
U+O	0,435	0,361	3,61
U+O	0,121	0,034	0,34
U+O	0,617	0,55	5,5
U+O	0,253	0,171	1,71
U+O	0,237	0,155	1,55
U+O	0,369	0,292	2,92
U+O	0,116	0,029	0,29
U+O	0,407	0,332	3,32

1. b) Resultados obtidos no teste de TBARS no tecido pulmonar:

Amostras	Valores	Resultados	micromol./ mg de ptn
GC	0,029	8,405	4,203
GC	0,02	5,862	4,441
GC	0,029	8,248	4,660
GC	0,02	6,045	*
GC	0,053	14,619	3,052
GC	0,004	1,666	*

GC	*	*	*
GU	0,04	11,263	4,008
GU	0,046	12,836	3,123
GU	0,042	11,735	3,513
GU	0,021	6,071	7,404
GU	0,019	5,731	8,554
U+B	0,02	5,966	6,088
U+B	0,041	11,447	3,657
U+B	0,03	8,51	4,835
U+B	0,031	8,746	4,579
U+B	0,046	12,705	3,343
U+B	0,002	1,142	*
U+B	0,022	6,57	3,532
U+B	0,039	10,791	3,658
U+B	0,03	8,589	3,014
U+E	0,046	12,81	2,898
U+E	0,036	10,109	4,177
U+E	0,051	13,964	3,414
U+E	0,048	13,282	3,752
U+E	0,059	16,219	3,511
U+E	0,034	9,664	3,189
U+E	0,015	4,734	5,505
U+E	0,01	3,344	*
U+O	0,019	5,678	6,760
U+O	0,023	6,832	5,466
U+O	0,048	13,308	4,146
U+O	0,039	10,975	3,040
U+O	0,012	3,895	*
U+O	0,071	19,313	3,511
U+O	0,023	6,806	3,980
U+O	0,023	6,596	4,255

U+O	0,037	10,45	3,579
U+O	0,016	4,944	*
U+O	0,041	11,368	3,424

1. c) Resultados obtidos com o teste da Catalase, Superóxido dismutase e relação SOD/CAT:

GRUPOS	UCAT/mg de prot	USOD/mg de prot	SOD/CAT
GC	10,12	14,89646954	1,471607824
GC	9,68	21,82453077	2,253715117
GC	10,58	16,09787508	1,521626806
GC	9,17	27,45744097	2,994006328
GC	6,63	10,11198586	1,5245125
GC	7,04	13,13887794	1,865494661
GC	*	*	*
GU	14,31	30,47851265	2,12972313
GU	13,38	20,58460272	1,53841655
GU	10,17	23,32633543	2,294480054
GU	12,52	21,2585034	1,698267498
GU	14,03	23,97506593	1,708961588
U+B	16,13	33,87533875	2,100328502
U+B	13,00	16,60302175	1,276893858
U+B	21,51	29,49852507	1,371634321
U+B	11,66	26,90341673	2,306704118
U+B	8,41	15,09661836	1,79485035
U+B	7,92	22,64492754	2,860845605
U+B	9,62	16,68056714	1,733126792
U+B	10,75	14,77541371	1,374322448

U+B	8,13	13,67989056	1,682567304
U+E	11,32	22,76867031	2,01137993
U+E	12,06	20,64835846	1,711757807
U+E	8,60	20,69108214	2,407206893
U+E	7,74	20,27163998	2,618904978
U+E	10,24	22,3015165	2,177395705
U+E	16,23	30,7408546	1,894065144
U+E	10,88	30,95017023	2,845319334
*	*	*	*
U+O	7,39	26,9179004	3,641205384
U+O	21,98	58,65102639	2,668733256
U+O	9,96	23,90628735	2,400882151
U+O	8,06	17,44591766	2,163589198
U+O	11,86	43,01126469	3,625891937
U+O	9,70	15,65435191	1,61321818
U+O	10,86	30,04807692	2,767432741
U+O	11,28	30,59039462	2,712017183
U+O	13,22	20,85940759	1,57815741
U+O	16,14	31,05590062	1,924627143
U+O	7,74	36,04902668	4,656839546

1. d) Resultados obtidos com o teste do cometa:

	Média Cabeça	Média Cauda	Cauda/Cabeça
GU 33	25,51914554	92,66032758	3,631012153
GU 34	53,5117832	196,859926	3,678814538
GU 35	63,4722007	185,4067171	2,921069619
GU 36	59,1462403	190,824466	3,226316077
U+O 15	62,1180291	129,9916225	2,092655295
U+O 45	72,0310197	146,5048739	2,033913646
U+O 47	71,0849325	138,4336339	1,947439901
U+O 48	72,6367686	162,6670045	2,239458165
U+O 49	71,5362472	154,0542448	2,153513091

U+O 50	77,855797	159,355782	2,046806894
U+O 52	78,7622056	162,783238	2,066768404
U+O 53	67,2186463	148,241379	2,20536097
U+O 54	71,2866901	154,394759	2,165828695
U+O 58	63,5908874	142,599669	2,242454459
U+E 9	108,9238675	122,5703356	1,125284462
U+E 10	60,28194061	135,9582546	2,255372891
U+E 11	49,45628636	127,2090383	2,572151038
U+E 12	69,79185798	154,7960872	2,217967706
U+E 9	108,9238675	122,5703356	0,888664186
U+E 10	60,28194061	135,9582546	0,443385661
UE 11	49,45628636	127,2090383	0,388779658
U+E 12	69,79185798	154,7960872	0,450863192
U+E 13	71,0856	187,2311	0,379667694
GC 55	67,92649737	117,2035269	1,725446349
GC 57	72,84616898	116,7887519	1,60322435
GC 59	75,78644333	103,8929265	1,370864259
GC 31	491,9117727	493,830347	1,003900241
GC 46	69,25924273	90,40228242	1,305273908
GC 55	67,92649737	117,2035269	0,579560182
GC 57	72,84616898	116,7887519	0,623743021
GC 59	75,78644333	103,8929265	0,729466826
GC 31	491,9117727	493,830347	0,996114912
GC 46	69,25924273	90,40228242	0,766122722
GC 56	64,00126899	101,4165572	0,631073178
GC 30	65,72392313	94,95050111	0,69219143
U+B 44	83,59853857	120,9567759	1,446876679

1.e) Resultados obtidos com a análise da expressão das isoformas das NOS:

	NOS 1	NOS 2	NOS 3
U	40	57,31707	49,68944
U	43,47826	55,34591	55,22388
U	*	47,68212	51,36986
U	43,47826	*	47,40741
U	*	*	*
U+O	28,67647	18,27957	15,53398

U+O	35,08772	18,27957	11,92661
U+O	32,73991	13,88889	14,65517
U+O	25	20,49689	11,60714
U+O	35,39823	21,08844	13,59223
U+O	35,01299	17,2043	12,84404
U+O	32,25806	14,28571	15,51724
U+O	35,59322	14,44444	13,39286
U+O	35,15625	18,63354	15,17857
U+O	35,43956	*	*
U+E	32,7044	17,3913	21,42857
U+E	22,62774	15,07936	19,08333
U+E	28,84615	19,59459	22,12389
U+E	35,15625	13,33333	16,81416
U+E	31,6129	16,98113	19,84127
U+E	28,46715	14,63415	18,94771
U+E	26,28205	20,97902	22,13115
U+E	29,92701	12,5	14,91228
U+E	31,41026	*	*
U+B	32,67327	54,28571	12,62136
U+B	19	42,65734	6,481482
U+B	16,66667	23,63636	10,67961
U+B	15,59633	19,25466	7,339449
U+B	31,73077	53,27103	12,4031
U+B	23,52941	40,55944	10,71429
U+B	19,25926	27,67296	11,65049
GC	26,86567	17,6056	15,6463
GC	15,32847	16,54676	20,8633
GC	18,57143	17,26619	11,1111
GC	19,86755	16,21622	12,3188

GC	19,73469	18,30065	14,7651
GC	24,08759	17,14184	15,0355

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaltoma SH, Lipponen PK, Viitanen J, Kankunnen JP, Ala-Opas MY, Kosma VM. The prognostic value of inducible nitric oxide synthase in local prostate cancer. *BJU Int* 2000; 86(3):234-9.

Aikens, J, Dix, TA. Perhydroxyl radical (HOO•) Initiated lipid-peroxidation—The role of fatty-acid hydroperoxides. *J. Biol. Chem*, 1991, 266, 15091–15098.

Albanes D, Heinonen OP, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M. Alpha- tocopherol and beta- carotene supplements and lung cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance. *Journal of National Cancer Institute* 1996; 88: 1560-70.

Allen RG e Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad Biol Med*, 2000; p. 463-499.

Almeida, SP; Silva, JA Piqui e buriti: Importância alimentar para a população dos cerrados. *Planaltina: EMBRAPA*, 1994; CPAC, 38p.

American Cancer Society, Tipos e epidemiologia do câncer de pulmão. Visualizado em 13 de fevereiro de 2013. <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/index>

Andrade- Sobrinho LG, Boscolo M, Lima-Neto BS, Franco DW. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). *Quim Nova* 2002; 25: 1074-7.

Angelis R. Reflexões a respeito do elo dieta e saúde. *Arq. Gastroenterol.* 2001, 38:4.

Antonangelo L, Bernardi FDC, Capelozzi VL, Takagaki T, Younes R, Yagi N, Saldiva PHN. Morphometric evaluation of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) is useful in predicting long-term survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Chest*. 1997, 111: 110-114.

Araújo, D.F. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): an economically valuable species of the Central Brazilian cerrados. *Economic Botany*, 1995; v.49, n.1, p.40-48.

Arnheim, N. e Cortopassi G. Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues. *Mutat, Res*, 1992. 275: 157–167.

Arts TJ.; Dallinga, JS; Voss, HP; Haenem G; Bast, A. A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chemistry*, 2003, v.80, p.409-414.

ATBC Alpha tocopherol, beta-carotene cancer prevention study group. The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med* 1994; 88: 1560-70.

Asano K, Chee CBE, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM and Stamler JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994, 91:10089-10093.

Barreiros ALBS, David JM, Juceni PD. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*. 2006; (29) 113-123

Benzie, I.F.F. Evolution of dietary antioxidants. *Comparative Biochemistry and Physiology*; 2003, v.136, p.113-116.

Bernardi, FDC, Antonângelo, L, Beyruti, R, Takagaki, T, Saldiva, PHN, Capelozzi, VL morphometric evaluation of histopathological slides is useful in predicting long-term outcome of patients with squamous cell carcinoma of the lung. A preliminary report. *Chest* 1995; 107: 614-620.

Bernardi, FDC, Antonângelo, L, Beyruti, R, Takagaki, T, Saldiva, PHN, Capelozzi, VL. Clinical, pathological and biological markers of prognosis in surgically resected squamous cell carcinoma of the lung. *Modern Pathology* 1997; 10 (10): 992-1000.

Bertram, R. Hass, Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging, *Biol. Chem.* 389 (2008) 211–220.

Beutler T; Renard M.; Offord, E; Schneider H.; Ruegg, U. Green tea extract decreases muscle necrosis in mdx mice and protects against ROS. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2002; v.75, p.749-753.

Berenblum I, Ben-Ishai D, Haran-Ghera, Lapidot A, Simon E, Trainin N. Skin initiating action and lung carcinogenesis by derivatives of urethane (ethyl carbamate) and related compounds. *Biochemical Pharmacology* 1959; 2: 168-76.

Bianchi MLP and Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutrição*. 1999, 12(2): 125-130.

Bonnefoy M, Dray J, Kostka T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives 2002. *Presse Medicale* 31 (25): 1174-84.

Carvalho HA, Takagaki TY, Saldiva PHN, Capelozzi V. Stereological estimates of the nuclear/cytoplasmic ratio and star volume on fiberoptic biopsies are of prognostic value for survival in a preliminary study of advanced squamous cell carcinoma of the lung. *Histopathology* 1997; 31: 420-429.

Carvalho PEO, Antonângelo L, Bernardi FDC, Leão LEV, Rodrigues RO, Capelozzi VL. Useful Prognostic Panel Makers to Express the Biological Tumor Status in Resected Lung Adenocarcinomas. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 2000; 30 (11): 478-486.

Céspedes, CL, Mohammed, EH; Pavon, N; Alarcon, J. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolics extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), maqui. *Food Chemistry*, 2008; v.107, p.820-829.

Cerqueira FM, Medeiros MHG and Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim. Nova*, 2007, 30: 441-449.

Cerutti PA. Oxy-radicals and cancer. *Lancet*, London, 1994; 344: 862-3

Cibeira GH and Guaragna RM. Lipídio: fator de risco e prevenção do câncer de mama. *Rev. Nutrição* 2006, 19: 65-75.

Chaudiere J.; Ferrali-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 1999; v.37, p.946-962.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *Faseb J*. 2003. 1195-1124.

Cury PM, Lichtenfels AJ, Reymão MS, Conceição GM, Capelozzi VL, Saldiva PH. Urban levels of air pollution modifies the progression of urethane-induced lung tumours in mice. *Pathol Res Pract*. 2000; 196(9):627-33.

Demarchi LMMF, Reios MM, Palomino SAP, Farhat C, Takagaki TY, Beiruti R, Saldiva PHN, Capelozzi VL. Prognostic Values of Stroma Proportion and PCNA, K67 and p53 Proteins in Patients with Resected Adenocarcinoma of the Lung. *Modern Pathology*, 2000; 13(5): 511 – 520.

Demarchi LMMF, Palomino SAP, Farhat C, Takagaki TY, Beyruti R, Capelozzi VL. Correspondence re.. Prognostic values of stromal proportion and PCNA, Ki-67 and p53 proteins in patients with resected adenocarcinoma of the lung. Letter to the editor. *Modern Pathol*, 2001. 14(4): 366-367.

Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Persuasive evidence that quinone reductase type 1 (DT diaphorase) protects cells against the toxicity of electrophiles and reactive forms of oxygen. *Free Radic Biol Med*, 2000; (29):231–240.

Diplock AT. Antioxidants and disease prevention. *Molecular Aspects of Medicine*, 1994, v.15, n.4, p.295-376.

Edge R, Mcgarvey D, Truscott G. The carotenoids as antioxidants – a review. *J. Photochem. Photobiol. Biol. B*, 1997, v. 41, p. 189-200.

Ferreira ALA. Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras*, 1997, v. 43, n. 1.

Fujimoto H, Ando Y, Yamashita T, Terazaki H, Tanaka Y, Sasaki J, Matsumoto M, Suga M. e Ando M. Nitric Oxide Synthase in Human Lung Cancer. *Jpn. J. Cancer Res*. 1997, 88: 1190-1198.

Fukushima S, Kinoshita A, Puatanachokchail R, Kushida M, Wanibuchi H, Morimura K. Hormesis and dose-response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non- genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis* 2005: 1835-45.

Gomes F. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento do câncer. *Rev. Nutrição*, 2007; 20(5):537-548.

Gutteridge JM.; Halliwell, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a

historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000; v.899, p.136-147.

Halliwell, B.; Clement, M.V.; Long, L.H. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 2000; v.486, p.10-13.

Halliwell, B. Oxidative stress, nutrition and health. *Free Radical Research*, 1999. v.25, p.57-74.

Halliwell B. e Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 3 ed. Clarendon, Oxford, 2000. P.936.

Hassimoto NMA.; Genovese, IS, Lajolo, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005; v.53, p.2928-2935.

Hsia CCW, Hyde DM, Ochs M e Weibel ER. An Official Research Policy Statement of the American Thoracic Society/ European Respiratory Society: Standards for Quantitative Assessment of Lung Structure. *Am. Resp. Crit. Care Méd*; 2010.181: 394-418.

International Agency for câncer research on câncer (IARC). IARC handbooks of câncer prevention: carotenoids. Vol 2. Oxford, United Kingdom: Oxford Univerdity Press, 1998:39.

INCA. Instituto Nacional do câncer. Tipos de câncer e epidemiologia (2012).

Disponível

em:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao/ddefinição>

Karakaya, S. Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2004; v.44, n.6, p.453-464.

Kerr, W.E.; Silva, F.R.; Tchcarramae, B. Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2007; v.29, n.1, p.169-171.

Khan N, Afaq F, Kweon MH, Kim KM and Mukhtar H. Oral Consumption of pomegranate fruit extract inhibits growth and progression of primary lung tumors in mice. *Cancer Res*, 2007, vol. 67 (7).

Khoury J, Resck IS, Poças-Fonseca M, Sousa TMM, Pereira LO, Oliveira ABB e Grisólia CK. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of na aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar Brasiliense* Camb). *Genet. Mol. Biol.* 2007, vol. 30.

Kuti, J; Konuru, H.B. Antioxidant capacity and phenolic content in leaf extracts of tree spinach (*Cnidioscolus spp.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. v.52, n.1, p.117-121.

Krinsky NI. Carotenoidas as antioxidants. *Nutrition*, 2001, v. 17, p. 815-817.

Krinsky NI. The biological properties of carotenoids. *Pure Appl. Chem*, 1994, v. 66. P.1003-1010.

Laval F, Wink DA, Laval J. A discussion of mechanisms of NO genotoxicity: implication of inhibition of DNA repair proteins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1997, 131:175-91.

Lechner M, Lirk M, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin. *Seminars in cancer biology*. 2005, 15: 277-289.

Lee SD, Park SK, Lee ES, Kim HM, Lee CW, Lee K, Kang MR, Lee KS, Lee J, Hwang WI, Kim DC. A lipid-soluble red ginseng extraxt inhibits the growth of human lung tumor xenografts in nude mice. *J. Med. Food*. 2010, 13(1): 1-5.

Lima, A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. *Tese de Doutorado*, 2008, 182 p.

Lima A, Silva AMO, Trindade RA, Torres RP and Mancini-Filho J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). *Rev. Bras. Frutic*. 2007, 29: 695-698.

Lima ES e Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Bras. Ciênc. Farmac*. 2001, 37: 293-303.

Manach, C; Donovan J.. Pharmacokinetics and metabolim of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research*, 2004. v.38, n.8, p.771-785.

Mariano-da-Silva, S. et al. Chemical characteristics of pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) native of three municipalities in the State of Goiás-Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2009, v. 29, n.4, p. 771-777.

Matheus RS, Bernardi FD, Gallo CP, Silva AGP, Rodrigues OR, Capelozzi M, Lopes A, Fenezelian S, Saldiva PHN, Capelozzi VL. Nuclear Markers (Star Volume, Mitotic Index, AgNOR and Ki-67) of the Primary Tumor and Its Metastasis in Non-Small Cell Lung Carcinomas. *Pathology Research and Practice* 2004; 200: 13-23,.

Menezes AMB; Horta BL, Oliveira et al, et al. Risco de câncer de pulmão, laringe e esôfago atribuível ao fumo. *Rev Saúde Pública*, São Paulo, 2002; 36.

Mena S, Ortega A, Estrela J. Mini review Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Environmental Mutagenesis*. 2009. 674:36-43.

Min, K; Eleber, SE Flavonoid affects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food and Chemical Toxicology*, 2008. v.46, p.96-104.

Minamoto H, Antonângelo L, Silva AGP, Gallo CP, Andrade e Silva FB, Fenezelian S, Rodrigues OR, Jatene F, Saldiva PHN, Capelozzi VL. Different cell and microenvironment profiles in metastatic and non-metastatic non-small cell lung carcinomas. *Histopathology* 2003; 43: 427-443.

Miles, E.A.; Zooubouli, P.; Calder, P.C.; Phil, D. Differential anti-inflammatory affects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition*, 2005; v.21, p.389-394.

Miranda-Vilela AL, Resk IS and Grisólia CK. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. *Genetics and Molecular Biology* 2008a, 31(4): 956-963.

Miranda-Vilela AL. Pereira LCS. Gonçalves CA. Grisólia CK. Pequi fruit (*caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. *Nutrition Research* 2009b, 29: 850-858.

Miranda-Vilela AL, Akimoto AK, Alves PCZ, Pereira LCS, Klautau-Guimarães MN e Grisolia CK. Dietary carotenoid-rich oil supplementation improves exercise-induced anisocytosis in runners: influences of haptoglobin, MnSOD (Val9Ala), CAT (21 A/T) and GPX1 (Pro198Leu) gene polymorphisms in dilutional pseudoanemia ("sports anemia"). *Genet. Mol. Biol.* 2010c, 33: 359-367.

Mirvish SS. The carcinogenic action and metabolism of urethane and N-Hydroxyurethane. *Advances Cancer Res* 1968; 11: 1-36.

Murakaoa, S.; Miura, T. Inhibition by uric acid of free radicals that damage biological molecules. *Pharmacology & Toxicology*, 2003; v.93, p.284-289.

Narayan C, Kumar A. Antineoplastic and immunomodulatory effect of polyphenolic components of *Achyranthes aspera* (PCA) extract on urethane induced lung cancer in vivo. *Mol. Biol. Rep*, 2013.

Nepomuceno J. Dieta e câncer: Vitaminas Antioxidantes. *Biosci J*. 2005; v. 21:(1), 141-146.

Omenn GS, Goodman GE, Thornquit MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial. *Journal of National Cancer Institute* 1996; 88: 1550-9.

Olson JA. Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, 1996; 126 Supl 4: 1208-12.

Parra ER, Bielecki LC, Ribeiro JMFP, Balsalobre FA, Teodoro WR, Capelozzi VL. Association between decreases in type V collagen and apoptosis in mouse lung chemical carcinogenesis: a preliminary model to study cancer cell behavior. *Clinics* 2010; 65(4): 425-32.

Parra ER, Park JY, Rizzardi F, Takagaki T, Saito DMS, Rodrigues OR, Capelozzi VL. Prognostic index expression of cyclin-d1, c-erbB-2 and VEGF: metastases vs corresponding primary cancers and metastatic vs non-metastatic adenocarcinomas. *Histol Histopathol*, 2008.

Perez, E. Diagnóstico fitoquímico dos frutos de *Caryocar brasiliense* Camb. Caryocaraceae. Curitiba, 2004. 115p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de

Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Paraná.

Peto R, Doll R, Sporn MB. Can dietary Betacarotene materially reduce human cancer rates? *Nature*. 1981, 290: 201-208.

Pillai GR, Srivastava AS, Hassanein TI, Chauhan DP and Carrier E. Induction of apoptosis in human lung cells by curcumin. *Cancer Letters*. 2004, 208: 163-170.

Pinto CA, Carvalho PEO, Antonângel L, Garippo A, Silva AGP, Soares F, Younes R, Beyruti R, Takagaki TY, Saldiva PHN, Vollmer RT, Capelozzi VL. Morphometric Evaluation of Tumor Matrix Metalloproteinase 9 Predicts Survival after Surgical Resection in Adenocarcinoma of the Lung. *Clin Ca Res*, 2003; 9: 3098-3104.

Podsedeck, A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. *LWT: Journal of Food Composition and Analysis*, 2007; v. 40, p.1-11.

Pukaskas A.; Van Beek, De Waard A. Development of a triple hyphenated HPLC-radical scavenging detection-DAD-SPE-NMR system for the rapid identification of antioxidant in complex plant extracts. *Journal of Chromatography*, 2005; v.1074, p.81-88.

Qin, Z.; Reszka, K.J.; Fukai, T.; Weintraub, N.L. Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. *Translational Research*, 2008; v.51, n.2, p.68-78.

Ramos, M.I.L.; Umaki, MC.S.; Hiane, P.A.; Ramos Filho, M.M. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitaminicos "A" da polpa do piqui (*Caryocar brasiliense* Camb). *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 2001; v.19, n.1, p.23-32.

Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clin. Interv. Aging*, 2007; (2): 219-236.

Ramasamy K, Dwyer-Nield S, Serkova NJ, Hasebroock KM, Tyagi A, Raina K, Singh RN, Malkinson AM, Agarwal R. Silibinin Prevents Lung Tumorigenesis in Wild-Type but not in iNOS^{-/-} Mice: Potential of Real-Time Micro-CT in Lung Cancer Chemoprevention Studies. *Clin Cancer Research*, 2010; 17 (4), p753-761.

Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, 2007; 55: 207-217.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*; 2007; (22):659–61.

Reymão MSF, Cury PM, Lichtenfels AJFC, Lemos M, Bathlener CN, Conceição GMS, Capelozzi VL, Montes GS, Junior MF, Martins MA, Bohn GM, Saldiva PHN. Urban air pollution enhances the formation of urethane-induced lung tumors in mice. *Environ Res* 1997; 74: 150-158.

Ribeiro, R.F. Pequi: o rei do cerrado. Belo Horizonte: *Rede Cerrado*, 2000. 62p.

Rizvi SI, Maurya PK. Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans. *Mol. Biotechnol*, 2007; (1):58-61.

Rodrigues OR, Antonângelo L, Franco Filho EC, Capelozzi VL, Saldiva PHN. Prognostic significance of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining in mediastinal lymph nodes metastasis and resected non-small cell lung cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 1997; 27.

Rodrigues-Amaya, D.B. Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, and stored foods. Arlington: *OMNI Project*, 1997. 88p.

Saad PCB. *Efeitos da associação do Beta-Caroteno, Alfa-Tocoferol e do Fumo no Câncer de Pulmão* [tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina. FAMERP; 2006.

Saito DM, Franco MR, Parra ER, Ab'saber AM, Farhat C, Eher E, Soufen MA, Rodrigues R, Capelozzi VL. Cell cycle regulator in primary lung adenocarcinoma and its haematogenous metastases. *Histopathology*, 2007; 50: 525-527.

Sakano K, Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi S, Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide is involved in oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 703-14.

Sandau K, Pfeilschifter J, Brune B. The balance between nitric oxid and superoxide determines apoptotic and necrotic death of mesangial cells. *J Immunol* 1997; 158(10):4938-46.

O. Sergent, B. Griffon, P. Cillard, J. Cillard, Alcohol and oxidative stress, *Pathol.Biol*, 2001; 49: 689–695.

Serracarbassa, P.D. Vitaminas antioxidants na degeneração macular relacionada à idade. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 2006; v.69, n.2, p.443-445.

Sies, H.; Stahl, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1995; v.62, p.1315-1321.

Sies, H.; Stahl, W.; SevanianE, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *Journal of Nutrition*, 2005; v.135, n.5, p.969-972.

Silva C. e Naves M. Suplementação de Vitaminas na prevenção do câncer. *Rev. Nutrição*, 2001; 14(2): 135-143.

Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutrição*. 2002, 15(1): 71-81.

Steen, M The origin of oncogenic mutations: where is the primary damage? *Carcinogenesis*, 2000; (21): 1773–1776.

Toyokuni S. Okamoto K. Yodoi J. Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.*, 1995, n. 358, p. 1-3.

Trainin N, Precerutti A, Law LW. Trends in carcinogenesis by urethane administered to newborn mice of different strains. *Nature* 1964; 202: 305-6.

Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC (eds). *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics: Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. IARC Press: Lyon, France, 2004. p. 12-15.

Valko M, Rhodes CJ, Rhodes J, Moncol M, Izakovic M, Mazur M.: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 2006; 160, 1-40.

Zimmerli B, Schlatter J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutat Res* 1991; 259: 325-50.

Wang D, Wang J_L, Zhu F, et al. *In vitro* and *in vivo* studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). *Food Chemistry*, v.107, p.1421-1428, 2008.

Wasowicz W. Néve J. Peretz A. Optimized Steps in Fluorometric Determination of Thiobarbituric Acid- Reactive Substances in Serum: Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin. Chem.* 39(12): 2522-2526, 1993.

Wu, A.I. Cederbaum, Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res. Health* 27; 2003; 277–284.

APÊNDICE

PROTECTIVE EFFECT OF PEQUI OIL AND EXTRACT IN THE OXIDATIVE DAMAGE INDUCED BY URETHANE LUNG CARCINOGENESIS

¹Natália B.R. Colombo, ¹Maristela P. Rangel, ²Márcia Hage, ³Daniel P. Gelain, ⁴Denise F. Barbeiro, ⁵Cesar K. Grisolia, ¹Edwin Roger Parra Cuentas, ¹Vera Luiza Capelozzi.

¹Departament of Pathology, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil; ²Laboratory of Atmospheric Pollution, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Departament of Oxidative Stress, Universidade do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil; ⁴Departament of Clinical Emergency, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁵Departament of Genetic and Morfology, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil.

Running title: Pequi Fruit effect on lung carcinogenesis.

Oral Presentation at the 2013 European Respiratory Congress (Silver Sponsorship)

Grants: FAPESP 2011/02118-3 and FAPESP 2011/12030-1

Address correspondence to:

Vera Luiza Capelozzi

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Department of Pathology

Av. Dr. Arnaldo 455, Room 1143

CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brazil

Phone – 55-11 3061-7427; FAX – 55-11 3064-2744

e-mail: vcapelozi@lim05.fm.usp.br

Abstract

The antioxidant effects of *Caryocar brasiliense* Camb, most known as pequi fruit, have not yet been evaluated for possible protective effects of oxidative damage in lung carcinogenesis. In the present study we evaluated the role of this fruit against DNA damage and oxidative stress induced by urethane in mice. In vivo lung tissue comet assay test was performed to assess DNA damage and estimating the changes in lipid peroxidation and redox cycle antioxidants monitored the oxidative stress. Pre supplementation with 15µl of oil or extract of Pequi for 60 days significantly reduced the oxidative stress induced by urethane. The protective effect against damage was associated with modulation of lipid peroxidation, low proteic and genic expression of NOS. These findings indicate that the intake of the pequi fruit can lead to protection against in vivo genotoxicity and oxidative stress.

Key words: pequi, *Caryocar brasiliense* Camb, oxidative stress, DNA damage, lung cancer.

1. Introduction

Lung cancer (LC) is the major cause of death among other types of cancer representing 28% of the deaths caused by the disease in the whole world ^[1]. Its prevalence has been increasing whereas in the last 20 years the death rate for neoplastic diseases has decreased in developed countries ^[2]. Treatments include surgery, radiotherapy and/or chemotherapy. However, chemotherapy suffers limitations of side-effects, toxicity and drug resistance. Also, most established chemotherapy drugs are lacking specificity towards tumor cells ^[3]. Therefore, there has been a growing interest in the use of fruits as a promising source of more efficient new therapeutic anticancer drugs. In addition, recent trends in the management of cancer development include increasing awareness and chemoprevention that suggest using natural or synthetic chemicals to prevent initiation and promotional events associated with cancer development ^[4,5].

A large number of laboratory investigations have demonstrated the antioxidant properties of fruits belonging to the family of Caryocaraceae ^[6 - 13]. The findings from epidemiological surveys suggest that there is a strong association between the high intake of antioxidant fruits and a lower risk of diseases and cancer ^[14,15]. As a result, an increased consumption of antioxidant fruits has been considered as a practical strategy for reducing the incidence of cancer ^[16-22]. In this context, common antioxidant fruits such as *Caryocar brasiliense* Camb, most known as pequi, a native fruit from the Brazilian savannah ^[6,8,9] have not yet been evaluated for possible protective effects of oxidative damage in lung carcinogenesis.

Metabolites of urethane induce oxidative stress to DNA. It forms adducts through the involvement of C-hydroxylation to form vinylcarbamate, which is then converted to an epoxide that can interact with nucleic acid ^[23]. The resulting reactive species of oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) plays an important role in initiation, promotion and progression phases of the disease ^[24, 25]. The endogenous antioxidant enzyme defense as well as an adequate ingestion of exogenous sources of antioxidants prevents the oxidative damage caused by ROS and RNS, including DNA damage and lipid peroxidation ^[26, 27]. To test for in vivo DNA damage we carried out a series of biochemical, immunohistochemistry and molecular biology assays to assess the modulatory effects of this fruit on the oxidative stress induced by urethane carcinogenesis.

2. Materials and Methods

2.1 Lung tumor induction by urethane

All procedures were reviewed and approved by the Institute Ethics Committee for Animals Research (Internal Ethics Committee of the facilities of the Faculty of Medicine of the University of Sao Paulo 020/11). Lung carcinogenesis was induced in mice with 2 intra-peritoneal injections of urethane, a chemical carcinogen, in the concentration of 1.5 g/kg/dose ^[28]. The use of urethane for the induction of this type of cancer is a simple and widely known experimental model of lung cancer ^[28-33].

2.2 Animals and experimental design

Forty male BALB/C mice, 8 to 12 weeks old, were obtained from the animal facility of the Faculty of Medicine of the University of Sao Paulo (Brazil). The animals

were housed in plastic cages (six per cage), at room temperature and with free access to food and water. In the same day of the second dose administration of urethane, animals were divided into 5 groups and started to receive the supplementation of antioxidants. The control group (C; n=5) did not receive gavage or the urethane doses. All the other groups received the two doses of urethane and specific gavage treatment as follows. The Urethane Initiated Group (U; n=5) received two doses of urethane and did not received any gavage. The Pequi ethanolic extract group (UE; n=10) received two doses of urethane and daily gavage with 15µl of pequi ethanolic extract. The Pequi oil group (UO; n=10) received the two doses of urethane and daily gavage with 15µl of pequi oil. The last group, Beta-carotene group (UB; n=10), received urethane doses and daily gavage with 3µg/kg of beta-carotene diluted in corn oil. After 60 days of treatment, animals received an intra-peritoneal dose of a letal mixture of ketamine and xylazine. Later, they were exsanguinated by section of the abdominal aorta, with lungs removed en bloc. The extracted lungs were divided into 5 parts. Each part was destined to a different assay.

The optimal dose of pequi oil and pequi extract used in this work was established by two conducting pilot studies and based in published data that worked with these compounds ^[10-13]. The dose of beta-carotene was calculated with the transforming formula developed by Reagan-Shaw et al. ^[34], using a dosage close to the nutritional recommendations by the National Agency for Sanitary Surveillance for provitamin A carotenoids.

2.3 Chemicals and Plant Material

The chemicals xylazine, ketamine and urethane were provided by the pharmacy of our teaching hospital. Beta-carotene (β-carotene C9750) was obtained from Sigma

Aldrich, Califórnia, EUA. The corn oil used for the dilution of betacarotene was obtained from a local pharmacy. Plant material such as pequi oil and pequi ethanolic extract were provided by the Genetics and Morphology Department, University of Brasília, Brazil. All the compounds were kept in dark flasks, labeled and sealed to prevent oxidation until the moment of use.

2.4 Molecular Biology

Total RNA extraction was performed by the Trizol method as described elsewhere^[35]. cDNA synthesis was performed using 4µg of total RNA and SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit (Invitrogen life technology, Scotland, UK). Quantitative RT-PCR was done by the TaqMan assay according to the manufacturer's instructions for the gene expression quantification of NOS1, NOS2 and NOS3. Reactions were conducted on the StepOnePlus (Applied Biosystems, San Diego, California, USA). The data analysis was done through the StepOne software v2.0 (Applied Biosystems, San Diego, California, USA). Results displaying a CT intra-variation < 1.5 were further used to calculate average values. Data were expressed as CT values (the cycle number at which logarithmic PCR plots cross a calculated threshold line). Relative expression of genes of interest was normalized to that of GAPDH and gene expression in each sample was then compared with the expression in pool cells. The comparative CT method (CT) was used for quantification of gene expression and the relative expression was calculated as 2^{-CT} .

2.5 Immunohistochemistry

Immunohistochemistry to detect the expression of NOS-1, NOS-2 and NOS-3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA; dilution 1:100) was performed using a standard peroxidase technique. The dilutions were done using bovine serum albumin (BSA 0.5%, Sigma Diagnostics, St. Louis, USA). The Novolink Max Polymer (Novocastra Laboratories LTDA), pressure-cooking antigen retrieval, biotinylated rabbit antimouse IgG (Dako Corp; dilution 1:400), and streptavidin were used in combination with biotinylated horseradish peroxidase (Dako Corp; dilution 1:1000), diaminobenzidine tetrahydrochloride, and counterstaining with Hematoxylin. Brownish cytoplasmic staining in alveolar and bronchiolar cells was considered evidence of antigen expression.

NOS 1, 2 and 3 expression was assessed in ten fields by the point-counting technique, using a 100-point grid with a known area (62500 mm^2 at an X400 magnification) attached to the ocular of the microscope ^[36]. At 400X magnification, the area in each field was calculated according to the number of points hitting positive cells for NOS1, 2 and 3, as a proportion of the total grid area. The fractional area of positive cells determined as the number of positive cells in each field divided by the connective tissue area. The final results were expressed in percent.

Inter observer comparisons were performed in 20% of the slides by two observers (VLC and ERP). The coefficient of variation for the inter-observer error regarding cell count was < 5%.

2.6 Determination of antioxidant enzyme activity in lung tissue

Lung tissue catalase (CAT) activity was assessed by measuring the rate of decrease in H₂O₂ absorbance in a spectrophotometer at 240nm. The results are expressed as CAT units/mg protein. Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed

by quantifying the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer at 480nm and the results are expressed as SOD units/mg protein. A ratio between SOD and CAT activities (SOD/CAT) was applied to better understand the effect of pequi oil and pequi ethanolic extract treatment. Lung tissue glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by measuring the rate of NADPH oxidation in a spectrophotometer at 340 nm. The activity of GPx was expressed as Units (nmol NADPH oxidized/min)/mg protein.

2.7 Comet Assay Test

Fresh lung tissue was macerated and homogenized. Cells embedded in agarose on a microscope slide were lysed with detergent and high salt to form nucleoids containing supercoiled loops of DNA linked to the nuclear matrix. Electrophoresis at high pH resulting in structures resembling comets was performed as previously described ^[26]. Damaged cells were identified by the presence of a "tail", similar to a comet, formed by DNA fragments. The fragments were present in different sizes and were associated with the damage score.

2.8 TBARS test (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

To evaluate lipid peroxidation, the formation of TBARS was measured during an acid-heating reaction, which is widely adopted for measurement of lipid redox state. The samples were mixed with 0.6 ml of 10% trichloroacetic acid (TCA) and 0.5 ml of 0.67% thiobarbituric acid, and then incubated at 100°C for 25 minutes. TBARS were determined by the absorbance in a spectrophotometer at 532 nm. The results are expressed as nmol TBARS/mg protein.

2.9 Statistical Analysis

All data were analyzed by statistical tests for comparison, based on the distribution types of variables. Parametric distributions were considered, according to the statistical program SPSS version 10.0 (SPSS Inc, Illinois, USA). Values of each continuous variable were organized and described as mean and standard deviation. Student's T-test was used to compare the means of two groups of samples. Average comparison of three or more groups of samples was performed by the one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by appropriate *post hoc* tests, including Bonferroni for multiple comparisons. A *p* value < 0.05 was considered significant.

2. Results

Chemical Analysis of Pequi

Pequi pulp is a considerable source of antioxidants such as vitamin E, Vitamin C (78.3mg/100g of pulp), multiple carotenoids (7.25mg per 100g of pulp) such as beta-carotene (12.17mg/g), cryptoflavine (12.65 mg/g), cryptoxanthin (7.99 mg/g), atheraxanthin (31.28mg/g), zeaxanthin (79.93mg/g) and phenolic compounds (209mg per 100g of pulp) ^[6,7,8,9]. The pequi fruit pulp also provides in average 385 calories every 100gr, and it is an important source of dietary fiber (10.02%), lipids (33.4%) and protein (3%). The composition of lipids in pulp is 37.97% of saturated fatty acids and 61.35% of unsaturated fatty acids (55.87% oleic acid and 35.17% palmitic acid) ^[8,9,37].

Histopathologic analysis of lung tissues section

Low magnification of lung tissue specimens from control animals showed uniform histoarchitecture of lung parenchyma (Figure 1A) and thin alveolar walls (Figure 1B). In contrast, urethane-injected mice lung specimens were modified by the presence of small sub-pleural nodules in the parenchyma (Figure 1C and D) composed by slightly atypical epithelial cells round or oval, containing hyperchromatic nuclei, eosinophilic cytoplasm, in small acini arrangement. The atypical mitosis count was between 3 and 5/10 high-power fields.

Figure 1. Histopathology of lung tissue. Preserved alveolar acini with delicate alveolar walls in control mice (H&E, A, B). Urethane-injected mice lung tissue showing atypical epithelial nodule in subpleural localization composed by round or oval cells

containing abundant eosinophilic cytoplasm and hyperchromatic nuclei without evident nucleoli forming characteristics glands or acini (H&E, C and D).

Activity of the antioxidant enzymes in lung tissue

Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase were analysed in lung tissue specimens from control and urethane-injected mice. The SOD/CAT ratio was also analyzed. As shown in Figure 2A, catalase and SOD activity was higher in lung tissue specimens from urethane-injected mice than control mice, whereas glutathione value was similar in both groups. A similar activity of the antioxidant enzymes was present in lung tissue from supplemented and urethane-injected mice (Figure B, C and D).

Figure 2. Quantification of the activity of the antioxidant enzymes in lung tissue specimens. (A) Urethane injected mice shows a higher activity of catalase ($p=0.003$) and SOD ($p=0.07$) when compared to control. (B) There is no significant difference in

the activity of Catalase (B), Superoxide Dismutase (C), SOD/CAT ratio (D) and Glutathione Peroxidase (E).

Evaluation of Lipid Peroxidation

Figure 3 exhibits lipidic peroxidation in lung specimens stratified according to urethane-injected and supplemented groups. Compared to control mice, the oxidative damage in the polyunsaturated fatty acids of cell membranes was higher in urethane-injected mice lung specimens (Figure 3A). Animals supplemented with pequi oil, extract and beta-carotene presented lower levels of lipid peroxidation than urethane-injected mice lung specimens (Figure 3B).

Figure 3. Lipid Peroxidation in mice lung specimens. (A) Urethane injected mice shows a higher lipid peroxidation than control ($p=0.06$). (B) Animals that received the daily doses of antioxidants presents a lower lipid oxidation degree when compared to the urethane mices. (* $p<0.05$). Data reported as the mean $\pm$ SD for $n = 5$ per urethane-

injected and control mice and $n = 10$ per urethane-injected and supplemented mice. Groups were compared using Anova and t test. $P < 0.05$ were considered significant.

Comet assay in lung tissue

DNA oxidative damage in lung tissue specimens stratified according to the groups can be observed in Figure 4. Urethane-injected mice lung tissue presented a higher DNA damage (Figure 4A) coincident with an augment of the comet tail/head ratio (Figure 4C) when compared to controls (Figure 4A, 4B). Interestingly, lungs from animals that received the antioxidant supplementation presented a lower degree of DNA damage (Figure 4B).

Figure 4. DNA oxidative damage analyzed in lung tissue specimens. (A) Lung tissue from urethane – injected mice presents a higher DNA damage when compared to control ($p < 0.0001$). (B, C) The illustration of the degree of DNA damage is observed

in lung cells of control and urethane group, respectively. (D) The ratio of tail/head obtained by the comet measurement of supplemented animals (UO, UE and UB) shows a diminished DNA damage when compared to urethane group ($p < 0.0001$). (E) Degree of DNA damage in pequi oil supplemented animals. (F) Degree of DNA damage of animals that received the daily doses of pequi extract. (G) Degree of DNA damage of animals that received beta-carotene by gavage. Data reported as the mean $\pm$ SD for $n = 5$ per urethane-injected and control mice and $n = 10$ per urethane-injected and supplemented mice. Groups were compared using Anova and t test. $P < 0.05$ were considered significant.

Imunoexpression of Nitric oxid synthases 1, 2 and 3 in lung tissue

Different immunostaining intensity was exhibited by alveolar cells from urethane-injected and supplemented mice lung tissue (Figure 5) and this difference was confirmed by histomorphometry (Figure 6).

Nitric oxid synthases 1, 2, 3 immunoexpression by alveolar cells in urethane-injected mice lung tissue was higher than in control animals (Figure 6A). In contrast, lungs from animals that received the antioxidant supplementation presented a decreased immunoexpression of NOS1, 2, 3 when compared to the urethane-injected group (Figure 6B, C, D). Interestingly, an inverse association was found between NOS and mice supplemented with beta-carotene, which showed lower NOS1 (Figure 6B) and NOS3 (Figure 6D) and higher NOS2 (Figure 6C) lung expression than mice supplemented with the oil and extract of pequi. In addition, mice supplemented with pequi oil presented a diminished expression of NOS3 than the group supplemented with the extract (Figure 6D).

Figure 5. Immunostaining for NOS 1, 2 and 3. Representative NOS-stained in lung sections from control, urethane – injected and supplemented mice 28 are shown in histologic sections. (A-C) Control mice showing a few alveolar epithelial cells expressing NOS1,2,3. (D-F) Urethane-injected mice exhibiting numerous alveolar epithelial cells expressing NOS1,2,3 in lung tissue specimens. (G-O) Effects of antioxidants supplementation on alveolar epithelial cells reducing NOS1,2,3 expression detected by immunohistochemistry.

Figure 6. Quantification of NOS immunoexpression in lung tissue specimens. (A) NOS in urethane-injected and control mice * $p < 0.0001$. (B) NOS1 immunoexpression in urethane-injected and supplemented mice *UO, UE and UB vs U ($p < 0.001$) # UB vs UE and UO ($p < 0.05$). (C) NOS2 urethane-injected and supplemented mice *U vs UO, UE and UB ($p < 0.0001$), # UB vs UO and UE ($p < 0.05$). (D) NOS3 in urethane-injected and supplemented mice *U vs UO, UB and UE ($p < 0.001$), # UB vs UO and UE ($p < 0.001$), δ UE vs UO ($p < 0.001$). Data reported as the mean $\pm$ SD for $n = 5$ per urethane-injected and control mice and $n = 10$ per urethane-injected and supplemented mice. Groups were compared using Anova and t test. $P < 0.05$ were considered significant.

Gene expression of nitric oxide synthases

Gene expression of NOS stratified according to the groups can be visualized in Figure 7. As shown in Figure 7A, lung tissue samples from urethane-injected mice exhibited a higher gene expression of NOS3 in comparison to controls. Figure 7B shows that mice supplemented lung tissue does not modify NOS1 gene expression. A

lower gene expression of NOS2 is present in lung tissue from mice supplemented with antioxidant compared to those urethane-injected (Figure 7C). Compared to injected-mice, pequi oil and beta-carotene supplementation was associated with a lower NOS3 gene expression (Figure 7D).

Figure 7. Genic Expression of Nitric Oxid Synthases. (A) There is a significant higher gene expression of NOS3 in the urethane-initiated group when compared to control $^{*}(p<0.05)$. (B) There is no significant difference of the genic expression of NOS1 in studied groups. (C) Urethane-injected mice presents a higher gene expression of NOS2 than animals that received the antioxidant supplementation $^{*}U$ vs UO, UE and UB ($p<0.05$). (D) Animals treated with oil and beta-carotene shows a minor expression of NOS3 than urethane-injected mice $^{*}U$ vs UO and UB ($p<0.05$). Data reported as the mean $\pm$ SD for $n = 5$ per urethane-injected and control mice and $n= 10$ per urethane-injected and supplemented mice. Groups were compared using Anova and t test. $P < 0.05$ were considered significant.

4. Discussion

From the results of our current work it is apparent that the popular Pequi fruit oil and extract can exert a significant protective effect against oxidative damage induced by urethane. Furthermore, the findings from a series of biochemical assays suggest that the antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* Camb could have played an important role in reducing the effects of this genotoxic carcinogen.

Oxidative stress can cause DNA damage leading to chromosomal alterations. This potentially harmful genomic damage can be minimized when the antioxidant capacity of the organism is enhanced. Our present investigation has shown that supplementation of mice with antioxidants can inhibit DNA damage and lipid peroxidation, decreasing the expression of NOS isoforms.

The impact of the use of this fruit on practical routine has already been demonstrated with the commonly used chemotherapeutic drugs such as bleomycin and cyclophosphamide, a well-known agent, which can cause oxidative damage to DNA [11, 38]. This effect can be minimized by Pequi oil, probably due to the high concentrations of antioxidants present in the fruit [11, 12], thus reinforcing the known power of antioxidants to detoxify the cytotoxic metabolites of chemotherapy drugs [39]. In addition, some fruits such as Pequi are a really good source of flavonoids. It has already been shown that some flavonoids such as silibinin, may decrease the activity of NOS by the inhibition of cytokines that are able to regulate NOS expression through different signaling pathways [40]. Some flavonoids also have the characteristic of inhibiting the systemic toxicity of urethane, inhibiting the activation of STAT-3 and NF- κ B and other multiple pathways for the induction of pulmonary carcinogenesis by urethane [41,42]. Similarly, there is evidence for the role of antioxidants in providing

protection against the genotoxic carcinogen urethane^[42]. The antioxidant enzymes exert a likely mechanism to diminish the oxidative stress. However, in the current study, urethane also induced an augmented activity of some antioxidant enzymes. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase protects against the toxicity of quinones by reducing the generation of ROS from redox reactions and it is considered to be an important detoxification pathway^[43]. Exposure to genotoxins and/or radiations results in the over production of ROS and free radicals and impairment of the antioxidant system^[44,45]. Modulation of antioxidant status by Pequi oil and extract could possibly result in protection against induced DNA damage. Concerning to catalase and superoxide dismutase increase in the urethane injected mice, we understood this finding as an initial response to the oxidative insult, since the oxidative status can regulate gene expression and activity of these enzymes^[46 - 48]. We can also understand this finding as a compensatory mechanism to prevent oxidative damage^[47]. Nevertheless, this result may also be interpreted as not sufficient to inhibit or decrease the oxidative stress caused by urethane, since the injected mice lung tissue demonstrated an increased oxidative damage. On the other hand, supplemented mice lung tissue specimens presented a decrease in their oxidative damage suggesting that the real impact on the reduction of oxidative stress in this carcinogenesis model were the supplemented exogenous antioxidants from the Pequi.

Fruits are rich in phenolic compounds like flavonoids, saponins and tannins, which undergo hydrolysis to form biologically active products such as isothiocyanates and indole-3-carbinol^[49]. Previous chemical analysis of Pequi, a fruit from the Brazilian savannah, used for the pretreatment of mice in our work, showed the presence of sulphated disaccharides^[49, 50]. These phytochemicals are known to exert their protective effects by enhancing the elimination of potential carcinogenic agents from the body and increasing the transcription of tumor suppressor proteins^[51].

At the present, there is a growing awareness on the fact that synergistic/additive effects of complex mixtures of phytochemicals can lead to the observed antioxidant and anticarcinogenic effects of fruits and vegetables. Synergistic interaction among phytochemicals within fruits is an area of current interest ^[52, 53]. Pequi, besides containing phytochemicals, is also a rich source of other protective agents-like vitamin E, vitamin C, multiple carotenoids, cryptoflavine, cryptoxanthin, atheraxanthin, zeaxanthin and phenolic compounds ^[9 -11]. The pulp of the pequi fruit is also an important source of saturated fatty acids and unsaturated fatty acids ^[10 -13]. Therefore, in the present study we tested the modulatory effects of Pequi and not the isolated constituents, to assess the antioxidant effects of the chemopreventive phytochemicals in this fruit which may have similar or overlapping mechanisms.

In conclusion, our present study has demonstrated that the popular Pequi fruit possesses anti genomic damage and antioxidant properties. Further and larger studies have to be done in order to confirm the protective effect of the Pequi, including a mass spectral analysis to determine other major constituents.

6. References

- [1] Khan N, Afaq F, Kweon MH, Kim KM and Mukhtar H. Oral Consumption of pomegranate fruit extract inhibits growth and progression of primary lung tumors in mice. *Cancer Res* 2005, vol. 67 (7).
- [2] INCA. Instituto Nacional do câncer. Tipos de câncer e epidemiologia (2012). Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao/ddefinição>

- [3] Fukushima S, Kinoshita A, Puatanachokchail R, Kushida M, Wanibuchi H, Morimura K. Hormesis and dose-response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non- genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis* 2005: 1835-45.
- [4] Steinmetz K, Potter J. Vegetables, Fruits and Cancer Prevention: A Review. *Journal of the American Dietetic Association* 1996: (96) 1027-39.
- [5] Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* 1992: (18) 1 – 29.
- [6] Ribeiro, R.F. Pequi: o rei do cerrado. Belo Horizonte: *Rede Cerrado*, 2000. 62p.
- [7] Almeida, SP; Silva, JA Piqui e buriti: Importância alimentar para a população dos cerrados. *Planaltina*: EMBRAPA 1994; CPAC, 38p.
- [8] Ramos, M.I.L.; Umaki, MC.S.; Hiane, P.A.; Ramos Filho, M.M. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitaminicos “A” da polpa do piqui (*Caryocar brasiliense Camb*). *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 2001; v.19, n.1, p.23-32.
- [9] Lima A, Silva AMO, Trindade RA, Torres RP and Mancini-Filho J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense Camb*). *Rev. Bras. Frutic.* 2007, 29: 695-698.
- [10] Miranda-Vilela AL. Pereira LCS. Gonçalves CA. Grisólia CK. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense Camb*) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. *Nutrition Research* 2009, 29: 850-858.

- [11] Khouri J, Resck IS, Poças-Fonseca M, Sousa TMM, Pereira LO, Oliveira ABB e Grisólia CK. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of na aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar Brasiliense Camb*). *Genet. Mol. Biol.* 2007, vol. 30.
- [12] Miranda-Vilela AL, Resk IS and Grisólia CK. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense Camb*) pulp. *Genetics and Molecular Biology* 2008a, 31(4): 956-963.
- [13] Miranda-Vilela AL, Akimoto AK, Alves PCZ, Pereira LCS, Klautau-Guimarães MN e Grisolia CK. Dietary carotenoid-rich oil supplementation improves exercise-induced anisocytosis in runners: influences of haptoglobin, MnSOD (Val9Ala), CAT (21 A/T) and GPX1 (Pro198Leu) gene polymorphisms in dilutional pseudoanemia (“sports anemia”). *Genet. Mol. Biol.* 2010c, 33: 359-367.
- [14] Diplock AT. Antioxidants and disease prevention. *Molecular Aspects of Medicine*, 1994, v.15, n.4, p.295-376.
- [15] Nepomuceno J. Dieta e câncer: Vitaminas Antioxidantes. *Biosci J.* 2005; v. 21:(1), 141-146.
- [16] Silberstein T, Silberstein E, Saphier O. Lycopene and tomatoes – their effect on prevention of prostatic cancer. *Harefuah*, 2013; 152(8): 461-3,499.
- [17] Yang J, Xiao YY. Grape phytochemicals and associated health benefits. *Crit Rev. Food Sci Nutr*, 2013; 53(11): 1202-25.

- [18] Grosso G, Galvano F, Mistretta A, Marventano S, Nolfo F, Calabrese G, Buscemi S, Drago F, Veronesi U, Scuderi A. Red Orange: experimental models and epidemiological evidence of its benefits on human health. *Oxid Med Cell Longev*, 2013; 2013:157240.
- [19] Sun C, Huang H, Xu C, Li X, Chen K. Biological activities of extracts from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. Et Zucc): a review. *Plant Foods Hum Nutr*, 2013; Jun:68(2):97-106.
- [20] Takata Y, Xiang YB, Yang G, Li H, Gao J, Cai H, Gao YT, Zheng W, Shu XO. Intakes of fruits, vegetables, related vitamins and lung cancer risk: results from the Shanghai Men's Health Study (2002-2009). *Nutr Cancer*, 2013; 65(1):51-61.
- [21] Fragoso MF, Prado MG, Brabosa L, Rocha NS, Barbisan LF. Inhibition of mouse urinary bladder carcinogenesis by açai fruit (*Euterpe oleraceae* Martius) intake. *Plant Foods Hum Nutr*, 2012; 67(3): 235-41.
- [22] Adhami VM, Khan N, Mukhtar H. Cancer chemoprevention by pomegranate: laboratory and clinical evidence. *Nutr Cancer*, 2009; 61(6):811-5.
- [23] Tweats DJ, Blakey D, Heflich RH, Jacobs A, Jacobsen SD, Morita T, Nohmi T, O'Donovan MR, Sasaki YF, Sofuni T, Tice R. Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. *Mutat Res*, 2007; (627): 92-105.

[24] Halliwell, B.; Clement, M.V.; Long, L.H. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 2000; v.486, p.10-13.

[25] Diplock AT. Antioxidants and disease prevention. *Molecular Aspects of Medicine*, 1994, v.15, n.4, p.295-376.

[26] Nepomuceno J. Dieta e câncer: Vitaminas Antioxidantes. *Biosci J.* 2005; v. 21:(1), 141-146.

[27] Halliwell, B. Oxidative stress, nutrition and health. *Free Radical Research*, 1996. v.25, p.57-74.

[28] Parra ER, Bielecki LC, Ribeiro JMFP, Balsalobre FA, Teodoro WR, Capelozzi VL. Association between decreases in type V collagen and apoptosis in mouse lung chemical carcinogenesis: a preliminary model to study cancer cell behavior. *Clinics* 2010; 65(4): 425-32.

[29] Ramasamy K, Dwyer-Nield S, Serkova NJ, Hasebroock KM, Tyagi A, Raina K, Singh RN, Malkinson AM, Agarwal R. Silibinin Prevents Lung Tumorigenesis in Wild-Type but not in iNOS^{-/-} Mice: Potential of Real-Time Micro-CT in Lung Cancer Chemoprevention Studies. *Clin Cancer Research*, 2010; 17 (4), p753-761.

[30] Reymão MSF, Cury PM, Lichtenfels AJFC, Lemos M, Bathlener CN, Conceição GMS, Capelozzi VL, Montes GS, Junior MF, Martins MA, Bohn GM, Saldiva PHN. Urban air pollution enhances the formation of urethane-induced lung tumors in mice. *Environ Res* 1997; 74: 150-158.

[31] Trainin N, Precerutti A, Law LW. Trends in carcinogenesis by urethane

administered to newborn mice of different strains. *Nature* 1964; 202: 305-6.

[32] Parra ER, Park JY, Rizzardi F, Takagaki T, Saito DMS, Rodrigues OR, Capelozzi VL. Prognostic indice expression of cyclin-d1, c-erbB-2 and VEGF: metastases vs corresponding primary cancers and metastatic vs non-metastatic adenocarcinomas. *Histol Histopathol* 2008.

[33] Minamoto H, Antonângelo L, Silva AGP, Gallo CP, Andrade e Silva FB, Fenezelian S, Rodrigues OR, Jatene F, Saldiva PHN, Capelozzi VL. Different cell and microenvironment profiles in metastatic and non-metastatic non-small cell lung carcinomas. *Histopathology* 2003; 43: 427-443.

[34] Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb J*; 2007; (22):659–61.

[35] Rio DC, Ares MJ, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*; 2012; (6): 5439.

[36] Hsia CCW, Hyde DM, Ochs M e Weibel ER. An Official Research Policy Statement of the American Thoracic Society/ European Respiratory Society: Standards for Quantitative Assessment of Lung Structure. *Am. Resp. Crit. Care Méd*; 2010.181: 394-418.

[37] Araújo, D.F. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): an economically valuable species of the Central Brazilian cerrados. *Economic Botany*, 1995; v.49, n.1, p.40-48.

[38] Murata M, Suzuki T, Midorikawa K, Oikawa S, Kawanishi S. Oxidative DNA

damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. *Free Radical Biol Med*. 2004; (37):793–802.

[39] Zhong S, Huang M, Yang X, Liang L, Wang Y, Romkes, Duan W, Chan E, Zhou S. Relationship of glutathione S-transferase genotypes with side-effects of pulsed cyclophosphamide therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Clin Pharmacol*, 2006; (62):44–63.

[40] Tiku AB, Abraham SK, Kale RK. Protective Effect of the Cruciferous Vegetable Mustard Leaf (*Brassica campestris*) Against In Vivo Chromosomal Damage and Oxidative Stress Induced by c-Radiation and Genotoxic Chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49:335–342 (2008).

[41] Ramasamy K, Dwyer-Nield S, Serkova NJ, Hasebroock KM, Tyagi A, Raina K, Singh RN, Malkinson AM, Agarwal R. Silibinin Prevents Lung Tumorigenesis in Wild-Type but not in iNOS^{-/-} Mice: Potential of Real-Time Micro-CT in Lung Cancer Chemoprevention Studies. *Clin Cancer Research*, 2010; 17 (4), p753-761.

[42] Kemper RA, Myers SR, Hurst HE. Detoxification of vinyl carbamate epoxide by glutathione: evidence for participation of glutathione S-transferases in metabolism of ethyl carbamate. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995; (135):110–118.

[43] Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Persuasive evidence that quinone reductase type 1 (DT diaphorase) protects cells against the toxicity of electrophiles and reactive forms of oxygen. *Free Radic Biol Med*, 2000; (29):231–240.

[44] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford Univ Press, 1999; p 1–36.;

[45] Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the radiologist. Lippincott Williams & Wilkins, 2006, Sixth Edition

[46] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress – induced cancer. *Chem Biol. Interact*, 2006; (10):1-40.

[47] Rizvi SI, Maurya PK. Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans. *Mol. Biotechnol*, 2007; (1):58-61.

[48] Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clin. Interv. Aging*, 2007; (2): 219-236.

[49] Xing Y, White PJ. Antioxidants from Cereals and Legumes in Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects and Applications. *Champaign, Illinois*, 1996; p. 25-55.

[50] Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GA. Antioxidant activity of cerrado fruits. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 2007; 27(1): 53-60.

[51] Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharma*, 2006; (74):1397–1421.

[52] Wallig MA, Heinz-Taheny KM, Epps DL, Gossman T. Synergy among phytochemicals within crucifers: Does it translate into chemoprotection? *J Nutr*, 2005; (135): 2972S–2977S.

[53] Juge N, Mithen RF, Traka M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci*, 2007; (64):1105–1127.