UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Atividade antigenotóxica de compostos da dieta e sua influência na
expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo**

Juliana Mara Serpeloni

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Atividade antigenotóxica de compostos da dieta e sua influência na
expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Juliana Mara Serpeloni

Orientadora: Lusânia Maria Gregg
Antunes

Ribeirão Preto
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Serpeloni, Juliana Mara

Atividade antigenotóxica de compostos da dieta e sua influência na expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo. Ribeirão Preto, 2012.

127 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Antunes, Lusânia Maria Gregg.

1. Luteína. 2. Clorofila b. 3. Antigenotoxicidade. 4. Antioxidante. 5. Nutrigenômica. 6. Expressão gênica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Mara Serpeloni

Atividade antigenotóxica de compostos da dieta e sua influência na expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Lusânia Maria Gregg Antunes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais Paulino e Edna,
minha irmã Jamile e ao meu
namorado Gustavo*

AGRADECIMENTOS

A vida acadêmica, embora nos permita alguns privilégios, ao mesmo tempo exige de nós disciplina e persistência. Não temos mais alguém pra nos dizer o que fazer em cada momento, mas temos sempre alguém nos cobrando o tempo todo. Nunca passamos sozinhos pelas alegrias e pelas dificuldades, nunca chegamos sozinhos ao final. Existem sempre as pessoas a quem devemos os nossos mais sinceros agradecimentos, e são essas pessoas, que estiveram presentes nos momentos de dificuldade e de alegria, que eu agradeço...

Agradeço primeiro a Deus, porque foi assim que minha mãe me ensinou: “Filha, lembre-se sempre, você nunca está sozinha, primeiro Deus e depois sua família”. Obrigada Deus, por manter ao meu lado as pessoas que eu amo e que são importantes para minha vida e pra minha caminhada.

À minha família. Ao meu pai, Paulino, por ter me enchido de coragem quando me trouxe de mudança para Ribeirão Preto e disse “Um pai nunca deve dar as costas para um filho, mas eu sei que eu não fiz isto com você, apenas soltei as amarras para que você pudesse realizar os seus sonhos”. E um deles agora eu realizei pai, graças a você e a compreensão de família que você e a mãe me ensinaram. Eu achava que quanto mais devêssemos agradecimentos, mais escreveríamos palavras lindas pra mostrar a gratidão que sentimos. Pensando em como agradecer à minha mãe, acho que palavra nenhuma mostraria o tamanho de tudo que eu devo à ela, e eu tenho certeza que ela sabe disso. Portanto, AGRADEÇO À MINHA MÃE, Edna, e espero que as letras maiúsculas digam à ela tudo que eu não consegui escrever. À minha irmãzinha Jamile, pra quem eu tento ser “a irmã mais velha”, aquela pra quem ensinei as primeiras letras e o nome com giz num quadro negro velho. Aquela a quem eu tentei e tento ajudar e proteger o mais que eu posso, aquela em quem eu sempre penso em primeiro lugar. E ao meu avô, Octávio Zago, que sofre comigo nos jogos do Corinthians, aquele para quem prometi ser “doutora” e agora sou, não do tipo que ele gostaria (uma doutora tipo médica), mas do jeito que eu pude!

Ao Gustavo Strassacapa, que esteve ao meu lado quando eu terminei o ensino fundamental, o ensino médio, a universidade, o mestrado e ainda está do meu lado como namorado, amigo e companheiro. Espero que a próxima etapa importante da minha vida que você esteja presente seja o nosso casamento! Obrigada “gordinho” por, mesmo de longe, acompanhar todos os meus passos, as minhas alegrias, tristezas, derrotas e conquistas. Obrigada por entender a minha necessidade de estar longe e por continuar sonhando comigo, mesmo nos momentos em que nossos sonhos pareceram tão distantes da realidade.

À minha orientadora, Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes, pela oportunidade oferecida sem ao menos me conhecer, acreditando somente na minha primeira orientadora e nas minhas promessas. Como disse um amigo “aprender é, antes de tudo, aprender a caminhar, a perguntar e buscar as respostas possíveis. Aprender é parar e duvidar dos caminhos escolhidos e percorrê-los novamente se necessário”. Ao permitir que eu andasse nos meus próprios caminhos, você me fez crescer como pessoa e como pesquisadora.

À Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante, pesquisadora responsável pelo projeto temático “Avaliação integrada da estabilidade e propriedades funcionais de pigmentos naturais de alimentos”. Agradeço pela oportunidade oferecida dentro do projeto e também agradeço a Profa. Adriana por ter trazido da Suíça a preciosa luteína que eu utilizei em muitos dos meus experimentos.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi, por toda estrutura disponibilizada no Laboratório de Nutrigenômica e de Bromatologia e Nutrição do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP. Obrigada pelos conselhos que eu vou guardar pra sempre, e obrigada também pelas palavras de incentivo “Ela é ótima”, que sempre me deram força pra continuar o doutorado com mais e mais vontade de ser sempre melhor.

Aos técnicos do Laboratório de Nutrigenômica e de Bromatologia e Nutrição, Regislaine Valéria Burim e Jefferson Codognotto. Sou particular e especialmente grata à técnica Joana D’arc Castania Darin por ter me ajudado na execução de todos os experimentos, na hora e no momento em que foi preciso. Tenho certeza

que trabalhei com uma das técnicas mais bem dispostas a ajudar da FCFRP, e foi pra mim um privilégio.

Aos professores e funcionários da FCFRP, às secretárias, Rosemary Ioshimine Gerolineto e Rosana F. L. S. Florêncio, pelo cuidado e atenção dada aos alunos.

Aos amigos que me ajudaram com experimentos, análises e correções. Bruno Lemos Batista, Denise Grotto e Gustavo R. M. Barcelos, alunos do Prof. Dr. Fernando Barbosa Jr., a quem também agradeço por permitir que algumas análises fossem realizadas em seu laboratório. À Fabíola Singaretti de Oliveira, técnica especialista da FORP, por me ensinar e ter a paciência de realizar comigo todos os experimentos de PCR em tempo real e ao seu orientador Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa por ter disponibilizado o laboratório para as análises. Ao José Pedro F. Angeli bem como seu orientador, Prof. Dr. Paolo Di Mascio, do Instituto de Química da USP-SP pela ajuda nas análises bioquímicas de parâmetros de estresse oxidativo in vitro. Obrigada a todos pela recepção amigável, pela ajuda e principalmente pela paciência em me ensinarem e ajudarem nos experimentos.

Aos meus colegas e amigos de laboratório: Alexandre Ferro Aissa, Carla Machado, Cátia Lira do Amaral, Farah M. D. Chequer, Graciela Cristina dos Santos, Juliana Carvalho Ribeiro, Leonardo Meneghin Mendonça, Livia Hernandez, Marina Hernandez Silva, Marina Prearo Pizetta, Patrícia Furlan, Paula Lumy Takeuchi, Rafaela B. L. Bueno, Rita de Cássia Oliveira, Tarsila D. U. H. Pontes e Vinícius Venâncio. Agradeço em especial à minha colega de laboratório e amiga que eu espero manter pela vida inteira, Mara Ribeiro de Almeida. Obrigada amiga, por todos os bons e maus momentos que passamos juntas e por todas, todas mesmo, todas as horas em que você me escutou e foi tão atenciosa comigo.

Às minhas amigas Denise Grotto, Livia Cristina Hernandez e Mara Ribeiro de Almeida pela imensa ajuda nas correções finais da tese. Obrigada por terem se disponibilizado a ler essas longas 129 páginas de tese.

Aos meus amigos da “vida normal” e companheiros de casa: Mariane Simon, Patrícia Alves Ponte Monteiro, Denise Grotto, Lana Mara Tambelini e Elder Francisco Latorraca. Obrigada pela convivência amigável apesar de todas as dificuldades de se dividir uma casa com quem antes nem conhecíamos. Em especial, agradeço ao Eldinho e à Laninha. A vocês dois, meus parceiros até o fim, até na fase de final de tese, o maior obrigada do mundo, por tudo e por mais um pouco. Obrigada pela paciência e por estarem ao meu lado quase sempre, afinal vocês adoram me deixar sozinha. Vocês fizeram a minha vida longe de casa, da família, do namorado, dos amigos de infância ser suportável, ser prazerosa e, principalmente, ser inesquecível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todos que foram importantes direta ou indiretamente na realização desse trabalho e que, por falta de memória, mas não de gratidão, eu possa ter esquecido de mencionar nessas linhas.

MEU MAIS SINCERO MUITO OBRIGADA A TODOS!

"For my own part, I never was before engaged in any study that so engrossed my attention and my time as this has lately done."

Benjamin Franklin

RESUMO

SERPELONI, J. M. **Atividade antigenotóxica de compostos da dieta e sua influência na expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo**. 2012. 128 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Os pigmentos naturais, além de fornecerem cor e beleza aos diferentes organismos, desempenham importantes funções e ações biológicas, como as funções vitais de fotossíntese, respiração celular e a ação antioxidante. Assim, o presente estudo investigou os potenciais citotóxicos, genotóxicos e protetores dos pigmentos naturais clorofila b (CLb) e luteína (LT), isolados e em combinação, em doses normalmente consumidas na dieta. Para isso foram utilizados o teste do micronúcleo em células da medula óssea e do sangue periférico e o ensaio cometa em células do sangue periférico, rim e fígado de camundongos. Também foram avaliados parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo, glutathiona e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no rim e no fígado, além de glutathiona e catalase no sangue periférico, a fim de investigar o papel antioxidante desses pigmentos. A capacidade da LT de alterar a expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo e defesa antioxidante foi avaliada no tecido hepático dos camundongos utilizando a técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR) array. Para a verificação da atividade protetora dos pigmentos, a cisplatina (cDDP) foi utilizada como indutor de danos oxidativos e ao DNA. Adicionalmente, foram avaliados os potenciais citotóxicos, genotóxicos e antioxidantes da LT em cultura de células de hepatocarcinoma humano por meio do teste do MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio], ensaio cometa e avaliação de parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo, a fim de se estabelecer comparações entre resultados *in vitro* e *in vivo*, bem como propor mecanismos de ação para os efeitos antigenotóxicos da LT. Nossos resultados mostraram que os tratamentos com os pigmentos, tanto a LT quanto a CLb, isolados ou em combinação não causaram qualquer dano ao material genético nos testes empregados e ofereceram proteção frente aos danos induzidos no DNA pela cDDP tanto *in vitro* como *in vivo*. Efeitos antioxidantes para ambos pigmentos foram observados no sangue periférico e nos tecidos renais e hepáticos, e a LT também melhorou os parâmetros de estresse oxidativo avaliados *in vitro*. Na avaliação da expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo em células do fígado de camundongos, a cDDP diminuiu a expressão 16 genes, entre eles, importantes genes responsáveis pela manutenção do estado redox da célula. Além disso, a LT mostrou que pode atuar como antioxidante não só agindo diretamente no sequestro de radicais livres, mas também, induzindo a expressão de 11 dos 84 genes avaliados, e de 15 genes quando associada à cDDP. Em resumo, nossos resultados mostraram que a LT e a CLb, isoladas ou em combinação, nas doses consumidas normalmente na dieta, podem contribuir para a promoção da saúde considerando seus efeitos antigenotóxicos e antioxidantes.

Palavras-chave: luteína, clorofila b, antigenotoxicidade, antioxidante, nutrigenômica, expressão gênica.

ABSTRACT

SERPELONI, J. M. **Antigenotoxic activity of diet compounds and their influence in the expression of genes involved in response to oxidative stress**. 2012. 128 f. Thesis (Ph.D., Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The natural pigments, in addition to providing color and beauty to the different organisms, play important biological role, including the vital functions of photosynthesis, cellular respiration and antioxidant action. Thus, this study investigated the genotoxic and protective potential of natural pigments, alone and in combination, chlorophyll b (CLb) and lutein (LT), in concentrations usually consumed in the diet. For this purpose, we used the micronucleus test in bone marrow and peripheral blood cells and the comet assay in peripheral blood, kidney and liver of mice. Biochemical parameters of oxidative stress were also evaluated, such as glutathione and thiobarbituric acid reactive substances in the kidney and liver and catalase and glutathione in peripheral blood in order to investigate the antioxidant properties of these pigments. The ability of lutein to alter the expression of genes involved in oxidative stress response and antioxidant defense was evaluated in liver tissue of mice using the technique of real-time PCR (RT-qPCR) array. To verify the protective activity of the pigments, cisplatin (cDDP) was used as an inducer of oxidative stress and DNA damage. Additionally, we assessed the genotoxic and antioxidant potential of LT in cell cultures of human hepatocellular carcinoma using the test of MTT [3 - (4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium], comet assay and assessment of biochemical parameters of oxidative stress, in order to make comparisons between results *in vitro* and *in vivo*, as well to propose mechanisms to antigenotoxic effects of LT. Our results showed that treatment with the pigments, both the LT and the CLb, alone or in combination, did not cause any DNA damage in the tests employed and offered protection against DNA damage induced by cDDP in both *in vitro* and *in vivo*. Antioxidant effects were observed for both pigments in peripheral blood, kidney and liver, and LT also improved the oxidative stress parameters measured *in vitro*. In the evaluation of the expression of genes involved in response to oxidative stress in liver cells of mice, cDDP decreased the expression of 16 genes, among them, important genes responsible for maintaining the redox status of the cell. Moreover, LT showed that it can act as an antioxidant not only acting directly in the scavenging of free radicals, but also by inducing the expression of 11 of the 84 genes evaluated and 15 when LT was associated to cDDP. In summary, our results showed that the LT and CLb, alone or in combination, at concentrations usually consumed in the diet can contribute to health promotion considering their antigenotoxic and antioxidant effects.

Keywords: lutein, chlorophyll b, antigenotoxicity, antioxidant, nutrigenomics, gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pigmentos naturais classificados de acordo com suas estruturas químicas.....	4
Figura 2. Estrutura química da luteína e seu isômero zeaxantina.....	6
Figura 3. Quantidade dos carotenoides luteína e zeaxantina em alimentos em mol/100g.	6
Figura 4. Estrutura química da (a) clorofila a e da (b) clorofila b.....	9
Figura 5. Fotomicrografias obtidas de células de sangue periférico de camundongo na análise do ensaio cometa em microscópio de fluorescência. Em a) nucleóide sem migração do DNA e em b), nucleóide com cauda.....	14
Figura 6. Fotomicrografias obtidas no teste do micronúcleo em células a) da medula óssea e b) do sangue periférico de camundongos.....	16
Figura 7. Ferramentas de biologia molecular no estudo da interação entre a dieta e genoma.....	18
Figura 8. Protocolo experimental para análise <i>in vitro</i> da genotoxicidade e antigenotoxicidade da luteína por meio do ensaio cometa.....	27
Figura 9. Delineamento experimental dos estudos realizados <i>in vivo</i> com os pigmentos luteína e clorofila b isolados e em combinação.....	31
Figura 10. Porcentagem de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) viáveis no teste de viabilidade celular (MTT).....	38
Figura 11. Porcentagem de DNA na cauda no ensaio cometa em células de hepatocarcinoma humano (HepG2).....	39

Figura 12. Dosagem de glutathiona reduzida (GSH) em nmol/mg de proteína após tratamento de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) com a) cisplatina (cDDP) em diferentes concentrações, b) cDDP (1,0 μ M) em diferentes tempos de amostragem e c) cDDP (1,0 μ M) associada às diferentes concentrações de luteína (LT).....42

Figura 13. Dosagem de espécies reativas (ER) em unidades relativas de fluorescência após tratamento de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) com a) cisplatina (cDDP) em diferentes concentrações, b) cDDP (1,0 μ M) em diferentes tempos de amostragem e c) cDDP (1,0 μ M) associada às diferentes concentrações de luteína (LT).....43

Figura 14. Dosagem de citocromo-c (cit-c) em ng/ 10^6 células após tratamento de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) com a) cisplatina (cDDP) em diferentes concentrações, b) cDDP (1,0 μ M) em diferentes tempos de amostragem e c) cDDP (1,0 μ M) associada às diferentes concentrações de luteína (LT).....44

Figura 15. Representação dos efeitos biológicos encontrados para a cisplatina e a luteína em cultura de células de hepatocarcinoma humano (HepG2)..... 46

Figura 16. Porcentagem de DNA na cauda (% DNA) no ensaio cometa no sangue periférico 4 h após o primeiro tratamento (SP T0) e 4 h após a injeção de salina ou cDDP (SP T1), no fígado e no rim de camundongos..... 49

Figura 17. Frequência de células micronucleadas no sangue periférico de camundongos antes do início dos experimentos (1º dia - T0), 36 h após o primeiro tratamento (T1) e após a eutanásia (15º dia) e na medula óssea após a eutanásia (15º dia).....51

Figura 18. Relação (%) entre eritrócitos policromáticos (PCE) e o total de eritrócitos (PCE + NCE) na medula óssea de camundongos após a eutanásia (15º dia)..... 51

Figura 19. Papel do antioxidante endógeno glutathiona (GSH) na inativação de espécies reativas e na quelação da cisplatina (cDDP)..... 54

Figura 20. Gel de agarose RNA total de amostras de fígados de camundongos submetidos a diferentes tratamentos.....	56
Figura 21. Número de genes diferentemente expressos (expressão aumentada ou diminuída) em fígado de camundongos após diferentes tratamentos em relação ao grupo controle (OM).....	59
Figura 22. Representação da relação entre enzimas antioxidantes, glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG).....	59
Figura 23. Porcentagem de DNA na cauda (% DNA) no ensaio cometa no sangue periférico 4 h após o primeiro tratamento (SP T0) e 4 h após a injeção de salina ou cDDP (SP T1), no fígado e no rim de camundongos.....	64
Figura 24. Frequência de células micronucleadas no sangue periférico de camundongos antes do início dos experimentos (1º dia - T0), 36 h após o primeiro tratamento (T1) e após a eutanásia (15º dia – T2) e na medula óssea após a eutanásia (15º dia).....	65
Figura 25. Relação (%) entre eritrócitos policromáticos (PCE) e o total de eritrócitos (PCE + NCE) na medula óssea de camundongos após a eutanásia (15º dia).....	65
Figura 26. Porcentagem de DNA na cauda (% DNA) no ensaio cometa no sangue periférico 4 h após o primeiro tratamento (SP T0) e 4 h após a injeção de salina ou cDDP (SP T1), no fígado e no rim de camundongos.....	70
Figura 27. Frequência de células micronucleadas no sangue periférico de camundongos antes do início dos experimentos (1º dia - T0), 36 h após o primeiro tratamento (T1) e após a eutanásia (15º dia – T2) e na medula óssea após a eutanásia (15º dia).....	71
Figura 28. Relação (%) entre eritrócitos policromáticos (PCE) e o total de eritrócitos (PCE + NCE) na medula óssea de camundongos após a eutanásia (15º dia).....	72

Figura 29. a) Concentração de glutathione (GSH) e b) atividade da catalase (CAT) em sangue periférico de camundongos após eutanásia (15º dia)..... 73

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Variação de massa corporal durante o tratamento, expressos em gramas e porcentagem (%), e relações entre a massa do rim/massa corporal e a massa do fígado/massa corporal nos diferentes tratamentos (n=8).....48
- Tabela 2.** Avaliação do estresse oxidativo por meio das análises de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathione reduzida (GSH) em rim e fígado e GSH e catalase (CAT) em sangue total de camundongos submetidos a tratamento subagudo (15 dias)..... 53
- Tabela 3.** Dados da extração de RNA total (concentração e avaliação de pureza) das amostras de fígado de camundongos coletadas após eutanásia no 15º dia..... 56
- Tabela 4.** Aumento ou diminuição na expressão de diferentes genes em fígado de camundongos após tratamento subagudo com luteína (LT) e cisplatina (cDDP), isoladas ou em combinação.....58
- Tabela 5.** Variação de massa corporal durante o tratamento, expressos em gramas e porcentagem (%), e relações entre a massa do rim/massa corporal e a massa do fígado/massa corporal nos diferentes tratamentos (n=8).....63
- Tabela 6.** Avaliação do estresse oxidativo por meio das análises de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathione reduzida (GSH) em rim e fígado e GSH e catalase (CAT) em sangue total de camundongos submetidos a tratamento subagudo (15 dias)..... 67
- Tabela 7.** Variação de massa corporal durante o tratamento, expressos em gramas e porcentagem (%), e relações entre a massa do rim/massa corporal e a massa do fígado/massa corporal nos diferentes tratamentos, expressos em porcentagem (n=8).....69

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

% DNA	Porcentagem de ácido desoxirribonucleico na cauda
%R	Porcentagem de redução de danos
ABTS	2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina- 6-ácido sulfônico)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAT	Catalase
cDDP	Cisplatina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Cit-c	Citocromo-c
CL	Clorofila
CLa	Clorofila a
CLb	Clorofila b
CLc	Clorofila c
CLd	Clorofila d
Cle	Clorofila e
CM-DCF	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
CM-H ₂ DCFDA	Diacetato de 2,7-dicloro-di-hidrofluoresceína
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico
DTT	Ditioltreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
ER	Espécies reativas
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos
GPX	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro

GSH	Glutathiona
Hb	Hemoglobina
HepG2	Células de hepatocarcinoma humano
KRH	Tampão Krebs-Henseleit
LMP	Baixo ponto de fusão
LT	Luteína
MEM	Meio mínimo essencial
Mg	Magnésio
MMS	Metil metano sulfonato
MN	Micronúcleo
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzido
NCE	Eritrócito normocromático
NMP	Ponto de fusão normal
OM	Óleo mineral
PBS	Tampão fosfato-salino
PCE	Eritrócito policromático
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PÓS	Pós-tratamento
PRE	Pré-tratamento
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SIM	Tratamento simultâneo
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
XBP	Proteínas xantofila-ligantes

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Pigmentos.....	2
1.1.1 Pigmentos naturais, sintéticos e inorgânicos.....	2
1.1.2 Carotenoides e a luteína.....	4
1.1.3 Clorofilas.....	8
1.2 Defesa Antioxidante e Estresse Oxidativo.....	11
1.3 Detecção de Lesões Primárias no DNA (Ensaio Cometa) e de Instabilidade Cromossômica (Teste do Micronúcleo).....	13
1.3.1 Ensaio cometa como biomarcador de danos ao DNA em diferentes tipos celulares.....	13
1.3.2 Teste do micronúcleo em células da medula óssea e do sangue periférico de roedores.....	15
1.4 Ômicas e a Análise de Expressão Gênica por RT ² Profiler PCR Arrays.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivos Gerais.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
2.2.1 Experimentos com a LT.....	22
2.2.2 Experimentos com a CLb.....	22
2.2.3 Experimentos com a combinação dos pigmentos LT e CLb.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Obtenção dos Pigmentos.....	25
3.2 Cisplatina (cDDP) e Metil Metano sulfonato.....	25
3.3 Experimentos <i>In vitro</i>	25
3.3.1 Cultura de células HepG2.....	25

3.3.2 Teste de viabilidade celular.....	26
3.3.3 Tratamento das células.....	26
3.3.4 Dosagem de ER, GSH e cit-c em cultura de células HepG2.....	27
3.3.4.1 Dosagem de ER.....	28
3.3.4.2 Avaliação das concentrações de GSH.....	28
3.3.4.3 Quantificação da liberação de cit-c.....	29
3.4 Experimentos <i>In vivo</i>	29
3.4.1 Animais.....	29
3.4.2 Tratamento dos animais.....	30
3.4.3 Ensaio cometa em células do sangue periférico, rim e fígado.....	32
3.4.4 Teste do micronúcleo em células da medula óssea e sangue periférico.....	32
3.4.5 Dosagem de CAT e GSH no sangue total de camundongos.....	33
3.4.6 Análise das concentrações de TBARS e GSH no rim e no fígado de camundongos	33
3.4.7 RT ² Profiler PCR arrays.....	34
3.5 Análise Estatística.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Experimento 1: Testes <i>in vitro</i> para avaliação da genotoxicidade e atividade antioxidante da LT.....	37
4.2 Experimento 2: Testes <i>in vivo</i> para avaliação da genotoxicidade e atividade antioxidante da LT.....	46
4.3 Experimento 3: Investigação dos efeitos da LT na expressão gênica.....	55
4.4 Experimento 4: Testes <i>in vivo</i> para avaliação da genotoxicidade e atividade antioxidante da CLb.....	62
4.5 Experimento 5: Testes <i>in vivo</i> para avaliação da genotoxicidade e atividade antioxidante da combinação dos pigmentos LT e CLb.....	68
5. CONCLUSÕES.....	75
5.2.1 Experimentos com a LT.....	76
5.2.2 Experimentos com a CLb.....	77
5.2.3 Experimentos com a combinação dos pigmentos LT e CLb.....	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

7. ANEXOS.....	102
7.1 Aprovação Comissão de Ética em Experimentação Animal.....	103
7.2 Tabela de Genes Avaliados na Técnica de PCR Array.....	104

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Pigmentos

1.1.1 Pigmentos naturais, sintéticos e inorgânicos

Pigmentos são compostos químicos que absorvem luz em comprimentos de onda na faixa de luz visível. A produção da cor é devido a uma molécula específica (cromóforo) que capta energia dos elétrons e reflete a energia não absorvida que será capturada pelos olhos e transmitida ao cérebro onde poderá ser interpretada como cor (HARI; PATEL; MARTIN, 1994). Quando esses pigmentos são utilizados com o objetivo de conferir cor aos alimentos, roupas, medicamentos, cosméticos, entre outros, são chamados também de corantes. Quando são utilizados especificamente na coloração de alimentos são classificados dentro dos aditivos alimentares definidos pela *Food and Agriculture Organization* (FAO, 1974) como: “toda substância, que não apresenta valor nutritivo, adicionada ao alimento com a finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor e sabor; modificar ou manter seu estado físico geral, ou exercer qualquer ação exigida para uma boa tecnologia de fabricação do alimento.”

Os pigmentos podem ser classificados, quanto à origem, em naturais, sintéticos (ambos pigmentos orgânicos) e inorgânicos. Pigmentos inorgânicos (óxidos, sulfetos, hidróxidos, silicatos, sulfatos ou carbonatos) podem ser encontrados na natureza ou reproduzidos por síntese e apresentam como principais vantagens a estabilidade química e térmica (DELGADO-VARGAZ; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000). Pigmentos sintéticos são todos obtidos em laboratório mediante procedimentos químicos, são fáceis de produzir, mais baratos e com alto poder de coloração mesmo em pequenas quantidades (DOWNHAM; COLLINS, 2000). Os pigmentos naturais são produzidos por organismos vivos como plantas, animais, fungos e microrganismos (DELGADO-VARGAZ; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000). Existem ainda os pigmentos sintéticos idênticos aos naturais que são compostos orgânicos sintetizados em laboratório e que apresentam estruturas químicas semelhantes aos pigmentos naturais (ANVISA, 1977).

Os pigmentos naturais desempenham importantes funções além de fornecer cor e beleza, como exemplo, não haveria fotossíntese ou vida ao redor do mundo sem carotenoides e clorofilas (DELGADO-VARGAZ; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000). Dois aspectos têm chamado a atenção para o uso de pigmentos naturais em substituição aos sintéticos. Primeiro, a população tem mostrado, recentemente, certo

receio ao uso de pigmentos sintéticos, principalmente os utilizados em alimentos, uma vez que estudos clínicos demonstraram que alguns são prejudiciais à saúde devido à própria natureza química ou às impurezas que contêm (KAPADIA *et al.*, 1998). O amarelo de tartrazina e o amarelo crepúsculo, por exemplo, são conhecidos por causarem reações alérgicas e também reação cruzada com o ácido acetilsalicílico, paracetamol e outros corantes azóicos (GOMES *et al.*, 2007).

Além dessa recente associação entre pigmentos sintéticos e reações adversas, os pigmentos sintéticos apresentam somente um valor comercial enquanto os pigmentos naturais possuem importantes funções e ações biológicas. O potencial antioxidante dos pigmentos naturais já foi descrito na literatura (KRINSKY, 1998; STAHL; SIES, 2005) bem como a sua capacidade de atuar na prevenção de doenças multifatoriais como doenças cardiovasculares e o câncer (GIUGLIANO, 2000; RICCIONI, 2009), podendo assim, ser considerados como promotores da saúde humana. A utilização de termos como “alimentos saudáveis” devido às suas atividades biológicas gerou uma preferência mundial pelos pigmentos naturais e fez com que as pessoas interpretassem os pigmentos sintéticos presentes nos alimentos como contaminantes (DELGADO-VARGAZ; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000).

Bauernfeind (1981) divide os pigmentos naturais em cinco grandes grupos de acordo com as suas características estruturais (Figura 1):

- a) compostos N-heterocíclicos como as purinas presentes nos ácidos nucléicos;
- b) derivados de benzopiran representados pelas antocianinas e pelos flavonoides que tem sido amplamente estudados pelas suas propriedades benéficas à saúde humana, como revisto por Dixon (2004);
- c) as quinonas, o maior grupo em número de pigmentos e variações estruturais do qual fazem parte, por exemplo, as antraquinonas como o ácido carmínico ou vermelho carmim, amplamente utilizado como corante natural;
- d) derivados isoprenoides também chamados terpenoides representados principalmente pelos carotenoides;
- e) derivados tetrapirrólicos nos quais estão presentes as clorofilas e o grupamento heme encontrado na hemoglobina e mioglobina.

Figura 1: Pigmentos naturais classificados de acordo com suas estruturas químicas. Fonte: Adaptado de BAUERNFEIND, 1981.

Considerando os efeitos benéficos já descritos para os pigmentos naturais e que estudos nessa área ainda são escassos, torna-se cada vez mais interessante avaliar as atividades biológicas dos mesmos. Estudos nesse sentido podem ser úteis em dois aspectos: para recomendar a utilização dos pigmentos naturais, como corantes em alimentos em detrimento dos corantes sintéticos mais frequentemente utilizados e para incentivar o consumo de alimentos que possuem naturalmente grandes quantidades desses compostos, como as frutas e os vegetais. Nos dois aspectos considerados, poderia se esperar uma promoção da saúde tanto pela diminuição no consumo de compostos tóxicos quanto tendo em vista os efeitos benéficos dos pigmentos naturais para prevenção de doenças.

1.1.2 Carotenoides e a luteína

Entre todos os pigmentos presentes em organismos vivos, não há dúvidas de que os carotenoides são os mais amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em vegetais, fungos, bactérias e animais (MINGUEZ-MOSQUERA; HORNERO-MENDEZ; PEREZ-GALVEZ, 2002). Segundo Mayne (1996) mais de

1000 carotenoides foram isolados de fontes naturais e estruturalmente caracterizados. Eles são biossintetizados por várias plantas, algas e bactérias fotossintéticas, no entanto, animais, incluindo os humanos, não são capazes de sintetizá-los, devendo obtê-los por meio da dieta (SCHWEIGERT, 1998).

Os carotenoides com 40 átomos de carbono (C40) são todos derivados do licopeno, formados por 8 unidades de isopreno (C5). A partir do licopeno, são sintetizados todos os demais carotenoides por meio de modificações como ciclizações, funções oxidativas, rearranjos e degradações oxidativas (JACKSON; BRAUN; ERNST, 2008). Baseados em sua composição química, os carotenoides podem ser divididos em dois grandes grupos: os carotenos, como o betacaroteno e o licopeno, que são formados apenas por átomos de carbono e hidrogênio e as xantofilas que possuem átomos de oxigênio além de carbono e hidrogênio, e são representadas principalmente pela luteína (LT) e a zeaxantina (JOHNSON, 2002). A presença de grupos funcionais oxigenados modifica a biodisponibilidade dos carotenoides, tornando sua absorção e metabolização mais rápidas (OSHIMA *et al.*, 1997).

Naturalmente, os carotenoides exercem função crítica nos sistemas fotossintéticos de plantas, algas e bactérias, funcionando como pigmentos acessórios que absorvem energia da luz em comprimentos de onda fracamente absorvidos pela clorofila, aumentando a eficiência da fotossíntese. Adicionalmente, os carotenoides dissipam o excesso de energia, prevenindo a formação de espécies reativas (ER) e desativando o oxigênio singlete gerado durante a fotossíntese (KRINSKY, 1998). Do ponto de vista nutricional, a principal função fisiológica dos carotenoides é como precursor da vitamina A e entre os 50 diferentes carotenoides com essa função, o betacaroteno é o que tem maior atividade (KRINSKY; JOHNSON, 2005). Com relação às atividades biológicas, maior destaque é dado ao poder antioxidante dessas moléculas (KRINSKY; LANDRUM; BONE, 2003) devido à presença de elétrons deslocados ao longo de sua estrutura carbônica (YOUNG; LOWE, 2001). Além da atividade antioxidante, os carotenoides apresentam a capacidade de modular a transcrição (SHARONI *et al.*, 2003) e as respostas do sistema imune (CAMARA; BOUVIER, 2004).

A dieta humana pode conter até 40 carotenoides (GERSTER, 1997), a maioria obtida de frutas, vegetais e frutos do mar, sendo o betacaroteno, alfacaroteno, licopeno, LT e zeaxantina os predominantes (PARKER, 1989).

A LT e seu isômero (Figura 2) são carotenoides amarelos e podem ser encontrados na dieta humana, principalmente na gema de ovo, nos vegetais verdes folhosos escuros como o espinafre e a couve e em menor quantidade nas frutas (SOMMERBURG, 1998) (Figura 3).

Figura 2: Estrutura química da luteína e seu isômero zeaxantina. Fonte: Modificado de BHOSALE *et al.* (2004).

Vegetais/frutas	Luteína e zeaxantina	Luteína	Zeaxantina
Gema de ovo	89	54	35
Milho	86	60	25
Kiwi	54	54	0
Uva Itália	53	43	10
Abobrinha	52	47	5
Abóbora	49	49	0
Espinafre	47	47	0
Pimenta laranja	45	8	37
Pepino	42	38	4
Ervilha	41	41	0
Pimenta verde	39	36	3
Suco de laranja	35	15	20
Uvas verdes	31	25	7
Couve-flor	29	27	2
Cebolinha	29	27	3
Feijão-verde	25	22	3
Laranja	22	7	15
Brócolis	22	22	0
Maçã	20	19	1
Manga	18	2	16
Alface verde	15	15	0

Figura 3: Quantidade dos carotenoides luteína e zeaxantina em alimentos em mol/100g. Fonte: CANOVAS *et al.* (2009).

Em humanos, a maior parte dos carotenoides é encontrada no tecido adiposo (80-85%) e no fígado (8-12%), no entanto, as concentrações desses pigmentos também são altas no corpo lúteo do ovário e na glândula adrenal. No sangue, os carotenoides se encontram ligados a lipoproteínas circulantes, enquanto nos tecidos eles ocorrem em depósitos de gordura, no interior hidrofóbico das membranas e ligados aos domínios hidrofóbicos de proteínas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A LT e o seu isômero zeaxantina estão amplamente concentrados na mácula, uma pequena área da retina responsável pela visão central e alta acuidade visual, e são os únicos carotenoides presentes neste tecido (LANDRUM; BONE, 2001). Yemelyanov; Katz; Bernstein (2001) relataram a presença de proteínas xantofila-ligantes (*xanthophyll-binding proteins* ou XBP), as quais se ligam com alta afinidade e especificidade à LT na retina, o que pode explicar o acúmulo deste carotenoide na mácula. A proteína glutathione S-transferase 1 (GSTP1) é uma das XBP já identificadas no ser humano (BHOSALE *et al.*, 2004).

Tem sido proposto que a LT e o seu isômero podem prevenir o dano oxidativo induzido pela luz nas células da retina e então, proteger essas células da deterioração relacionada com o envelhecimento (KRINSKY; LANDRUM, 2003). Trabalhos recentes comprovaram o efeito protetor deste carotenoide frente às doenças oculares (HAMMOND, 2008; CARPENTIER; KNAUS; SUH, 2009; ROBERTS; GREEN; LEWIS, 2009) e também relataram que o consumo de alimentos ricos em LT, como o espinafre, é capaz de induzir o mesmo efeito protetor (HANKINSON *et al.*, 1992).

Além dos efeitos protetores descritos para a retina, que são os mais amplamente estudados, a LT está envolvida na prevenção de outras doenças. A presença de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais é um marcador da aterosclerose. Martin, Wu e Meydani (2000) mostraram que o tratamento dessas células em cultura com LT reduziu a expressão das moléculas de adesão. Estudos *in vitro* mostraram ainda que a migração de monócitos para as paredes arteriais, induzida pelo colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade também é diminuída após tratamento com LT (DWYER *et al.*, 2001). O uso tópico da LT parece exercer efeito de filtro também nas células da pele, diminuindo os efeitos da exposição solar (ROBERTS; GREEN; LEWIS, 2009; NILES, 2002; HEINEN, 2007).

Devido à grande importância da LT para a saúde humana, numerosas investigações vêm sendo feitas e vários artigos foram publicados. No entanto, estudos sobre a sua ação no material genético, como a indução de danos ou o seu possível efeito protetor frente aos agentes genotóxicos e mutagênicos ainda são escassos. Kruger *et al.* (2002) e Wang *et al.* (2006) utilizando diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* demonstraram ausência de efeito mutagênico da LT. Efeitos protetores relacionados principalmente à capacidade antioxidante da LT foram relatados por Santocono *et al.* (2006; 2007) *in vitro* e por Wang *et al.* (2006) em *Salmonella typhimurium*, mas estudos *in vivo* ainda não foram relatados.

Como corante alimentar a LT é permitida pela *Food and Drug Administration* por ser geralmente reconhecida como segura (generally recognized as safe ou GRAS) e até 3 mg de LT podem ser adicionadas à quantidade de referência normalmente consumida de cada alimento (FDA, 2011). No Brasil, a LT está entre os corantes naturais permitidos em alimentos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e também na forma de suplementos alimentares (ANVISA, 1977). Nos países em que a LT é utilizada como corante a sua obtenção é feita principalmente através das flores da planta *Tagetes erecta* (BREITHAUPT; WIRT; BAMEDI, 2002), mas algumas formas comerciais também são obtidas do espinafre.

1.1.3 Clorofilas

Ao contrário da maioria dos fitoquímicos encontrados na dieta em quantidades insuficientes para exercer efeitos biológicos, a clorofila (CLs) é encontrada em grande quantidade. As CLs eram consideradas apenas como os pigmentos responsáveis pela cor verde e pela fotossíntese nas algas, bactérias e nos vegetais, mas, atualmente, a ingestão de vegetais verdes está relacionada a um menor risco de desenvolvimento de doenças, tais como o câncer e doenças cardiovasculares (LANFER-MARQUEZ, 2003). O interesse pelas CLs não é tão grande quanto pelos carotenoides, no entanto, elas também têm demonstrado potencial protetor sobre mutágenos ambientais e provenientes da dieta (DOWNHAM; COLLINS, 2000).

Estruturalmente, os pigmentos de CLs são moléculas complexas pertencentes à classe das porfirinas, formadas por quatro anéis pirrólicos, com um átomo de magnésio (Mg) no seu interior e um quinto anel isocíclico. No quarto anel pirrólico, o ácido propiônico ali existente é esterificado por um álcool acíclico de cadeia longa,

geralmente o fitol, conferindo à CL um caráter hidrofóbico (GROSS, 1991). Existem várias formas de CLs sendo que as CLa e CLb (Figura 4) são encontradas em plantas superiores, em uma proporção de 3:1, enquanto que as CLc, CLd e CLe normalmente são encontradas em algas (SCHWARTZ; LORENZO, 1990).

Figura 4: Estrutura química da (a) clorofila a e da (b) clorofila b. Fonte: MAESTRIN *et al.* (2009).

Após a ingestão, o meio ácido do estômago favorece a feofitinação, que corresponde à remoção do átomo de Mg da molécula de CL (resultando na molécula de feofitina) deixando o Mg disponível para ser absorvido pelo organismo animal e contribuindo com as necessidades diárias deste mineral (FERRUZZI; FAILLA; SCHWARTZ, 2001). O Mg é um elemento essencial, que desempenha papel fundamental nas atividades enzimáticas e atua como cofator em mais de 300 reações metabólicas (WILBORN *et al.*, 2004). Após a digestão dos alimentos contendo CLs, moléculas de feofitina e feoforbídeos (CLs sem o grupamento fitol) são encontradas nas fezes, e o aparecimento dos últimos está relacionado principalmente ao metabolismo bacteriano do intestino grosso. Além de se apresentarem como uma importante fonte de Mg, as CLs também têm apresentado diferentes atividades biológicas, tanto na sua forma sintética (clorofilina) quanto na forma natural e seus derivados (FERRUZZI; FAILLA; SCHWARTZ, 2001).

Estudos *in vivo* relacionados à atividade biológica da CL natural são escassos devido à sua instabilidade química, portanto, a maioria das investigações de atividades biológicas utiliza a clorofilina cúprica (DASHWOOD *et al.*, 1998). A clorofilina é uma mistura verde brilhante derivada da CL natural que é usada como

suplemento alimentar e corante em alimentos (FERRUZZI; FAILLA; SCHWARTZ, 2002). Nesse derivado, o núcleo de Mg presente na CL natural é substituído por outro metal como cobalto, cobre ou ferro e os grupos ésteres metil e fitol são substituídos por sódio ou potássio (MORALES-RAMÍREZ; VALLARINO-KELLY; RODRÍGUEZ-REYES, 1996). Em contraste com as CLs naturais lipossolúveis, a clorofilina é altamente solúvel em água o que a torna mais eficiente na formação de complexos com carcinógenos nos sistemas aquosos *in vitro* (DASHWOOD *et al.*, 1998). Tanto as CLs naturais quanto a clorofilina cúprica são permitidas pelo FDA (FDA, 2002) e pela AVISA (ANVISA, 1977) para serem utilizadas como corantes alimentares.

A característica mais notável das porfirinas como a CL é a sua disponibilidade para formar quelatos com íons metálicos, deixando o metal firmemente fixado no espaço delimitado pelos quatro átomos de nitrogênio no sistema planar. Alguns autores sugerem que tanto as CLs naturais quanto a clorofilina exercem efeitos protetores sobre os danos induzidos no DNA, formando um complexo irreversível com o agente genotóxico, atuando como moléculas interceptoras (HARTMAN; SHANKEL, 1990; EDENHARDER; LEOPOLD; KRIES, 1995). Negraes *et al.* (2004) avaliaram a atividade da clorofilina *in vitro* e demonstraram um efeito protetor desse composto frente aos danos no DNA induzidos pelo etilmetanosulfonato. Efeito protetor sobre o DNA também foi relatado para a clorofilina em estudos empregando diferentes sistemas testes e diferentes indutores de danos (CHERNOMORSKY *et al.*, 1997; TANG; EDENHARDER, 1997; CHO *et al.*, 2000).

Além dos efeitos protetores sobre os danos no DNA, outros estudos sugerem o efeito antioxidante das CLs naturais e dos seus derivados sintéticos atuando no sequestro e bloqueio da atividade das espécies reativas (ER) (BRONZETTI; GALLI; DELLA-CROCE, 1990; FERRUZZI; FAILLA; SCHWARTZ, 2002; HSU *et al.*, 2005). Estudos realizados na década de 80 mostraram que tanto a CL como os seus derivados podem atuar como sequestradores de radicais livres inibindo o processo de autooxidação de óleos comestíveis (ENDO; USUKI; KANEDA, 1984; ENDO; USUKI; KANEDA, 1985). De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007), diversos compostos da dieta, incluindo os pigmentos naturais como a LT e a CL têm sido propostos como antioxidantes.

1.2 Defesa Antioxidante e Estresse Oxidativo

O termo “estresse oxidativo” se refere a um sério desequilíbrio entre a produção de ER e as defesas antioxidantes (HALLIWELL, 2007). Sies (1991) define o termo como uma perturbação no balanço pró-oxidante/antioxidante com saldo em favor do primeiro, levando a danos celulares.

O termo “espécies reativas” muitas vezes utilizado para identificar radicais livres, engloba uma série de espécies radicalares ou não radicalares derivadas tanto de oxigênio (EROs) como do nitrogênio (ERNs) e podem ser produzidas a partir de fontes endógenas e exógenas. Dentre estas espécies podemos citar espécies radicalares derivadas do oxigênio como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical perhidroxila ($HOO^{\cdot}$) e o radical hidroxila ($HO^{\cdot}$) e também espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e o oxigênio singlete (1O_2). As espécies radicalares derivadas do nitrogênio são representadas pelo óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) e o dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\cdot}$) e as não radicalares pelo peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

As fontes exógenas geradoras de ER incluem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, quimioterápicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002). Potenciais fontes endógenas incluem as mitocôndrias, o metabolismo do citocromo P450 e os peroxissomos (VALKO *et al.*, 2006). Peroxissomos são fontes de ER em condições fisiológicas formando H_2O_2 cuja eliminação é realizada pela enzima catalase (CAT) de forma compartimentalizada, devido à organização estrutural do peroxissomo (FRITZ *et al.*, 2007). O citocromo P450 também tem sido proposto como uma fonte de ER, e a sua indução leva à formação de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 possivelmente devido ao escape de espécies parcialmente reduzidas do ciclo catalítico da enzima e acredita-se que cerca de 1-5% dos elétrons direcionados à cadeia sejam “perdidos” diretamente para o oxigênio (HALLIWELL, 2007). Outra importante fonte endógena de ER são os neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Os macrófagos ativados apresentam um aumento no consumo de oxigênio que dá origem a uma variedade de ER, incluindo $O_2^{\cdot-}$, $NO^{\cdot}$ e H_2O_2 (CONNER; GRISHAM, 1996).

Considerando que as ER são formadas constantemente em sistemas biológicos, os organismos desenvolveram defesas antioxidantes de forma a proteger-se de possíveis danos celulares. Por definição, pode ser denominado antioxidante qualquer molécula que inibe ou minimiza um processo de oxidação. Do

ponto de vista biológico, um antioxidante protege biomoléculas ou estruturas celulares dos efeitos deletérios de substâncias que promovem a oxidação, como as ER (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2005). Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), as defesas antioxidantes de um organismo compreendem:

- a) agentes que removem cataliticamente essas ER, com destaque para a superóxido dismutase (SOD), CAT e a glutathione peroxidase (GPx);
- b) agentes que diminuem a formação de ER como as proteínas mitocondriais e as metalotioneínas;
- c) proteínas que protegem biomoléculas contra danos oxidativos por diferentes mecanismos como as chaperonas;
- d) compostos capazes de fazer a supressão ou “quenching” de ER como os carotenoides;
- e) e os agentes que são preferencialmente oxidados por ER como a glutathione (GSH), alfatocoferol, bilirrubina, ácido ascórbico, entre outros.

A diminuição das defesas antioxidantes, por exemplo, por mutações que diminuem as concentrações desses compostos, ou o aumento na produção de ER formadas tanto por via endógena quanto exógena resultam no estresse oxidativo. As consequências da alteração no estado redox das células incluem: (a) proliferação desordenada das células; (b) adaptação das células por meio do aumento na síntese das defesas antioxidantes; (c) senescência, onde as células sobrevivem, mas não são mais capazes de se reproduzir; (d) morte celular por apoptose ou necrose e (e) dano celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Ainda de acordo com Halliwell e Gutteridge (2007), existem formas diretas e indiretas de se avaliar as ER. As diretas incluem a ressonância de spin eletrônico (RSE) que detecta espécies contendo elétrons desemparelhados (como os radicais livres) e os biomarcadores de estresse oxidativo que detectam não as ER, mas sim os danos que elas causam em diferentes componentes celulares como proteínas, lipídios e DNA. O dano celular pode ser definido como resultado de um estímulo químico ou físico, em excesso ou deficiente, que pode alterar de forma temporária ou definitiva a homeostase da célula (NICOTERA; ORRENIUS, 1994). Entre os ensaios mais simples e mais utilizados para avaliação desses danos estão as proteínas carbonílicas, a detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o ensaio cometa, respectivamente para danos à proteínas, lipídios e DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Averiguar a depleção de um ou mais antioxidantes também é um meio de se avaliar as ER, no entanto, a depleção antioxidante não necessariamente significa que danos oxidativos ocorreram a diferentes moléculas, mas sim que as defesas antioxidantes foram utilizadas na remoção das ER. Além da depleção nas defesas antioxidantes, as ER também podem alterar a expressão de genes e proteínas. Por isso, quantificar antioxidantes ou avaliar a atividade das enzimas antioxidantes (presentes nas 5 classes descritas acima) bem como analisar a expressão de genes que as codificam são meios indiretos de avaliação do estresse oxidativo, que são chamados genericamente de biomarcadores de estresse oxidativo.

1.3 Detecção de Lesões Primárias no DNA (Ensaio Cometa) e de Instabilidade Cromossômica (Teste do Micronúcleo)

1.3.1 Ensaio cometa como biomarcador de danos ao DNA em diferentes tipos celulares

O ensaio do cometa é hoje amplamente utilizado como um método rápido, sensível e barato para analisar quebras de DNA em células eucarióticas associadas com exposição a agentes potencialmente genotóxicos (LOVELL; OMORI, 2008). O ensaio detecta alterações primárias no DNA ainda passíveis de serem eliminadas pelo sistema de reparo. Essas alterações, chamadas de danos genotóxicos, podem ou não ser fixadas no DNA resultando em uma mutação. O ensaio tem sido utilizado com sucesso na avaliação das interações entre antioxidantes e compostos genotóxicos (GAJECKA *et al.*, 1999) e tem se mostrado uma ferramenta válida para analisar se um antioxidante ou micronutriente é capaz de manter a integridade do material genético (PLAZAR *et al.*, 2007; GROTTTO *et al.*, 2009; ANGELI *et al.*, 2010). O ensaio é considerado uma poderosa ferramenta na investigação de compostos genotóxicos em células de roedores e humanos tanto *in vivo* como *in vitro*, além de ser recomendado por agências regulatórias, como a Environmental Protection Agency (EPA) (FARBAIRN *et al.*, 1995; CIMINO, 2006).

O princípio do ensaio é baseado na deposição de células em uma lâmina de microscópio contendo agarose com posterior lise usando detergente com alta concentração de cloreto de sódio deixando o DNA livre de membranas e histonas, o qual é chamado de “nucleoide” e é, então, submetido a eletroforese. As estruturas de cometa resultantes após a eletroforese são coradas e examinadas em microscopia de fluorescência (Figura 5). A intensidade da “cauda” em relação à

“cabeça” do nucleóide reflete o nível de danos no DNA, quanto maior a cauda, maior a quantidade de danos à molécula de DNA (AZQUETA; SHAPOSHNIKOV; COLLINS, 2009).

Figura 5: Fotomicrografias obtidas de células de sangue periférico de camundongo na análise do ensaio cometa em microscópio de fluorescência. Em a) nucleóide sem migração do DNA e em b) nucleóide com cauda. Coloração brometo de etídio. Aumento original 400X. Fonte: Laboratórios de Bromatologia e Nutrição e Nutrigenômica da FCFRP/USP, 2010.

Essa metodologia foi desenvolvida na década de 80 por Ostling e Johanson (OSTLING; JOHANSON, 1984) e, posteriormente, Singh e colaboradores (SINGH *et al.*, 1988) modificaram o ensaio para uma versão alcalina. A versão alcalina (pH > 13 do tampão de eletroforese) pode ser usada para detectar danos primários no DNA, como as quebras de fita simples e duplas, sítios álcali-lábeis e *crosslinks* entre DNA-DNA e DNA-proteína. Ao contrário das alterações que elevam as taxas de migração do DNA, os *crosslinks* podem estabilizar o DNA e inibir a migração, sendo sua detecção feita por meio de comparação de taxas de migração em relação ao controle negativo. Uma migração menor do que a migração presente no controle negativo indica a presença desses *crosslinks*, que são lesões relevantes para o processo de mutagênese (PFUHLER; WOLF, 1996; MERK; SPEIT, 1999).

O ensaio cometa pode ser realizado tanto *in vitro* como *in vivo*. Assim como a maioria dos testes realizados *in vitro*, a principal vantagem de se avaliar culturas celulares é o controle das condições ambientais (SCHMALZ, 1994). Tanto as culturas primárias quanto as linhagens celulares permanentes vêm sendo empregadas na avaliação da genotoxicidade *in vitro*, sendo que as últimas têm oferecido mais vantagens principalmente no cultivo (RIBEIRO *et al.*, 2005). A versão

in vivo do ensaio cometa é amplamente utilizada em testes de genotoxicidade e as suas vantagens incluem a aplicabilidade em diferentes órgãos, sensibilidade na detecção de baixos níveis de lesões, análise de pequeno número de células por amostra, fácil execução, curto período para conclusão dos experimentos e custo relativamente baixo (TICE *et al.*, 2000).

Entre os tecidos recomendados para avaliação de danos por meio do ensaio cometa estão o fígado e os rins. O fígado é o principal órgão metabolizador de compostos absorvidos, como consequência, as células hepáticas são expostas a doses significativas desses compostos químicos os quais podem levar às disfunções hepáticas, dano celular e mesmo falência do órgão (HART MANN, 2003; ROTHFUSS *et al.*, 2011). A integridade funcional dos rins também é vital para a homeostase corporal, uma vez que os rins desempenham papel principal na excreção de metabólitos, na regulação do volume do fluido extracelular, composição eletrolítica, balanço ácido-base, síntese e liberação de hormônios (GREGUS; KLAASSEN, 2001).

A alta porosidade dos sinusoides hepáticos e dos capilares renais permite a passagem de xenobióticos ligados a proteínas, o que facilita o acúmulo de compostos no fígado e nos rins (GREGUS; KLAASSEN, 2001). Esses dois órgãos têm sido amplamente utilizados em ensaios *in vivo* (WANG *et al.*, 2007; GAUDIN *et al.*, 2008; MIRANDA *et al.*, 2008) e também pelo nosso grupo de pesquisa (RIBEIRO *et al.*, 2010; SERPELONI *et al.*, 2010; SERPELONI *et al.*, 2011) para detecção de genotoxicidade e antigenotoxicidade de compostos. O papel fundamental desses dois órgãos na manutenção da homeostase corporal leva à indicação dos mesmos como prioridades nos ensaios de genotoxicidade. Além das células renais e hepáticas, o ensaio cometa em células do sangue periférico também tem se mostrado uma ferramenta simples para detecção de efeito genotóxico (PRÁ *et al.*, 2008; BROZOVIC *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2008).

1.3.2 Teste do micronúcleo em células da medula óssea e do sangue periférico de roedores

Entre os mais bem estabelecidos biomarcadores de mutações pode-se destacar o teste do micronúcleo que detecta alterações cromossômicas como a quebra ou perda de cromossomos inteiros resultantes da exposição a agentes endógenos ou exógenos (FENECH, 2007). Esse teste encontra-se em destaque,

dada à sua utilização em pesquisas na área de mutagênese (ZALACAIN; SIERRASESUMAGA; PATINO, 2005). O primeiro protocolo para o teste em camundongos foi desenvolvido por Schmid (SCHMID, 1975) usando células da medula óssea e foi modificado para análise em reticulócitos de sangue periférico por Hayashi (HAYASHI *et al.*, 1990) (Figura 6). No Brasil, a análise em medula óssea é recomendada pela Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (RIBEIRO *et al.*, 2004) para avaliação da mutagenicidade de diferentes compostos. Além disso, a maioria dos protocolos internacionais indica um teste citogenético em células hematopoiéticas de roedores como o teste definitivo para avaliação de danos genéticos *in vivo* (ROTHFUSS *et al.*, 2011).

Durante a divisão celular, o material genético contido no núcleo celular se replica e divide equitativamente originando duas células filhas idênticas. Este processo pode sofrer erros ou interferência de compostos capazes de agir no DNA ou no fuso mitótico gerando, respectivamente, quebras ou perdas de cromossomos inteiros. Quando isto acontece, o material genético fragmentado ou perdido não se incorpora corretamente ao núcleo da célula filha, originando o micronúcleo (FENECH *et al.*, 1999).

Figura 6: Fotomicrografias obtidas no teste do micronúcleo em células a) da medula óssea e b) do sangue periférico de camundongos. As setas indicam células micronucleadas. Coloração giemsa e laranja de acridina, respectivamente. Aumento original de 400X. Fonte: Livia Cristina Hernandez, Laboratórios de Bromatologia e Nutrição e Nutrigenômica da FCFRP/USP, 2011.

Recentemente, Crasta *et al.* (2012) demonstraram que os micronúcleos formados persistem nas células por diversas gerações e que os cromossomos nos micronúcleos podem ser segregados para as células filhas durante a divisão.

Demonstraram ainda que o DNA presente nos micronúcleos pode ser incorporado no genoma e contribuir para o desenvolvimento de células cancerosas.

Embora as células alvo da medula óssea e do sangue periférico sejam as mesmas, os eritroblastos, o método desenvolvido para o sangue periférico oferece vantagens como o fato das células nesse tecido serem mais uniformes e mais facilmente analisadas quando comparadas às células da medula óssea (CSGMT, 1995). Além disso, pequenas amostras de sangue podem ser retiradas repetidamente da cauda dos animais, permitindo um acompanhamento da frequência de danos durante o experimento (HAYASHI *et al.*, 1990). A possibilidade de avaliar os danos em diferentes tempos de amostragem está de acordo com as novas recomendações para reduzir o número de animais nos testes *in vivo*, obtendo dados de tratamentos agudo e subagudo no mesmo experimento (PFUHLER *et al.* 2009).

Experimentos que combinem o ensaio cometa e o teste do micronúcleo têm sido relatados na literatura e se mostram adequados e úteis na avaliação de dano e reparo de DNA devido às suas ações complementares (ANDERSSON *et al.*, 2007; CORONA-RIVEIRA *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2008; SERPELONI *et al.*, 2008). Resultados positivos para genotoxicidade e negativos para mutagenicidade permitem, por exemplo, inferências sobre os tipos de lesões geradas, lesões mais simples que podem ser reparadas ou mais complexas, não passíveis de reparo e também permite a avaliação de indução do sistema de reparo (COLLINS; DUTHIE; DOBSON, 1993). O teste do micronúcleo também tem sido uma importante ferramenta na identificação de fatores da dieta que minimizem a instabilidade cromossômica com o objetivo principal de diminuir o risco de desenvolvimento de doenças (THOMAS *et al.*, 2011).

1.4 “Ômicas” e a Análise da Expressão Gênica por RT² Profiler PCR Arrays

O rápido avanço das pesquisas em genética e biologia molecular, consequência do atual progresso das tecnologias empregadas nessas áreas, exige que técnicas mais avançadas sejam incorporadas aos testes clássicos de citogenética para melhor compreensão de como os compostos interagem com o DNA. Atualmente, é reconhecido que o entendimento do efeito na saúde, por exemplo de compostos da dieta como discutido neste estudo, requer estudos em nível molecular (GARCÍA-CAÑAS *et al.*, 2010).

O desenvolvimento das chamadas “ômicas”, como a genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica tem criado grandes oportunidades de aumentar o entendimento dos mecanismos pelos quais compostos da dieta estão relacionados com a saúde e a prevenção de doenças (FERGUSON; PHILPOTT; DRYLAND, 2007).

Uma das áreas de maior destaque atualmente no campo das “ômicas” (Figura 7) é a nutrigenômica a qual representa uma junção entre saúde, dieta e genoma e está focada em polimorfismos genéticos, expressão gênica e na interação do genoma com a dieta (AFMAN; MULLER, 2006). A nutrigenômica constitui a ciência base para o entendimento das variações humanas em preferências, necessidades e respostas à dieta e pode se tornar uma ferramenta para consumidores motivados em aconselhamento nutricional personalizado visando a manutenção da saúde e prevenção de doenças (KUSSMANN; PANCHAUD; AFFOLTER, 2010).

Figura 7: Ferramentas de biologia molecular no estudo da interação entre a dieta e genoma.
Fonte: Modificado de Trujillo, Davis e Milner (2006).

A expressão da informação genética pode ser regulada em diversas etapas por nutrientes e outros compostos bioativos da dieta. Consequentemente, analisar o papel dos compostos da dieta nas mudanças na expressão de genes é o primeiro passo para estudar o fluxo de informação molecular do genoma para o proteoma e

metaboloma, o que representa um dos principais objetivos nas pesquisas em nutrigenômica (MULLER; KERSTEN, 2003). A análise da expressão gênica global pode ser realizada com o uso da técnica de *microarray* enquanto a expressão de genes individuais é frequentemente avaliada por meio da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) quantitativa em tempo real (GOHIL; CHAKRABORTY, 2004).

Os *microarrays* de DNA são coleções de oligonucleotídeos, segmentos de DNA fita única (denominados sondas) geralmente anexados a uma lâmina de vidro em locais pré-definidos, representando milhares de genes. São utilizadas duas amostras de RNA de situações distintas, um controle e a amostra. Após a extração do RNA mensageiro e confecção do DNA complementar (cDNA), as amostras de cDNA são diferencialmente marcadas com compostos fluorescentes, geralmente as cianinas Cy3 e Cy5. Este cDNA marcado é, então, desnaturado por aquecimento e hibridizado com os oligonucleotídeos na lâmina de *microarray* e um *scanner* especial realiza a leitura da intensidade da fluorescência nos comprimentos de onda referente aos 2 compostos fluorescentes utilizados. As imagens digitalizadas são analisadas por um *software* específico que irá converter a cor e a intensidade da fluorescência em um conjunto de valores numéricos (STORHOFF *et al.*, 2004). A análise da vasta quantidade de dados de *microarrays* é uma tarefa árdua e os resultados positivos encontrados devem ser validados pela técnica de PCR em tempo real.

A PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) é uma técnica confiável e tem se mostrado uma ferramenta valiosa em análises quantitativas para a verificação de alterações na expressão gênica (NIKITINA *et al.*, 2003; SCHOSTAK *et al.*, 2006). Na análise de expressão gênica por RT-qPCR, o RNA mensageiro é convertido em cDNA e posteriormente amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos na presença de um corante fluorescente ou sondas. Os níveis de expressão de genes específicos são computados em relação à expressão de genes de referência, frequentemente genes constitutivos, sendo a escolha dos últimos um dos aspectos mais críticos dessa análise (GARCÍA-CAÑAS *et al.*, 2010).

O sistema "RT² Profiler PCR Array" representa a união da RT-qPCR Syber Green (no qual fluoróforos se ligam à fita-dupla de DNA, emitindo fluorescência) com a capacidade de avaliação de múltiplos genes do *microarray* podendo ser aplicado em estudos de toxicologia, oncologia, imunologia, entre outros. Neste sistema, dezenas a centenas de genes de vias metabólicas específicas podem ser avaliados

simultaneamente sem a necessidade da validação exigida pela técnica de *microarray*. PCR Arrays estão disponíveis para várias vias metabólicas, entre elas, apoptose, transdução de sinais, câncer e genes de resposta ao estresse oxidativo (BALUCHAMY *et al.*, 2010).

A união das ferramentas de biologia molecular com as metodologias de citogenética clássica neste estudo visam um melhor entendimento de como os pigmentos naturais como a LT atuam no DNA.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar *in vivo* e *in vitro* as atividades citotóxicas, genotóxicas e protetoras dos pigmentos naturais LT e CLb, isolados ou associados, bem como as possíveis alterações na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo/defesa antioxidante após tratamentos com o carotenoide LT.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Experimentos com a LT

- a) Avaliar *in vitro* a genotoxicidade, antigenotoxicidade e capacidade antioxidante da LT por meio do ensaio cometa, dosagem de ER, concentrações de GSH e liberação de citocromo-c (cit-c) em células de hepatocarcinoma humano (HepG2).
- b) Avaliar *in vivo* a genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos protetores da LT em células da medula óssea, rim, fígado e sangue periférico de camundongos, além de avaliar a capacidade antioxidante da LT por meio da dosagem de GSH e atividade da CAT no sangue periférico e da dosagem de TBARS e GSH em tecido renal e hepático.
- c) Investigar os efeitos da LT na expressão de 84 genes relacionados com a resposta ao estresse oxidativo e genes de defesa antioxidante em células hepáticas de camundongos por meio da técnica de RT-qPCR utilizando o sistema RT² Profiler PCR Array.

2.2.2 Experimentos com a CLb

- a) Avaliar *in vivo* a genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos protetores da CLb em células da medula óssea, rim, fígado e sangue periférico de camundongos, além de avaliar a capacidade antioxidante da CLb por meio da dosagem de GSH e atividade da CAT no sangue periférico e da dosagem de TBARS e GSH em tecido renal e hepático.

2.2.3 Experimentos com a combinação dos pigmentos LT e CLb

- a) Avaliar *in vivo* a genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos protetores da combinação dos pigmentos LT e CLb em células da medula óssea, rim, fígado e sangue periférico de camundongos, além de avaliar a capacidade antioxidante da combinação por meio da dosagem de GSH e atividade da CAT no sangue periférico.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção dos Pigmentos

O padrão de LT ($C_{40}H_{56}O_2$ – Figura 2) foi doado pela DSM Nutritional Products (Basiléia, Suíça) e a CLb ($C_{55}H_{70}MgN_4O_6$; CAS: 519-62-0 – Figura 3) extraída do espinafre foi adquirida da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Ambas foram diluídas em óleo mineral (OM) nas doses de 0,2 e 0,5 mg/kg p.c para os experimentos *in vivo*. A LT em diferentes doses para os experimentos *in vitro* (0,1; 1,0; 5,0; 10; 25,0; 50 e 100 μM) foi diluída utilizando como solvente o dimetilsulfóxido (DMSO) (CAS: 9008-97-3, Sigma) 1% em meio de cultura.

3.2 Cisplatina (cDDP) e Metil Metano Sulfonato (MMS)

No presente trabalho a cDDP (CAS: 15663-27-1) foi utilizada como indutor de danos ao DNA e estresse oxidativo, na sua fórmula comercial da Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Brasil) na dose de 6 mg/kg p.c. através de injeção intraperitoneal para os testes *in vivo*. Para os testes *in vitro* a cDDP foi diluída em DMSO 1% em meio de cultura, (mesmo solvente utilizado na diluição da LT), em diferentes concentrações (0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10 μM).

Para o ensaio cometa *in vivo*, um grupo controle positivo de animais tratados com MMS foi adicionado aos experimentos, uma vez que a cDDP não pôde ser considerada um controle positivo para esse ensaio por não induzir aumento na migração do DNA. O MMS (CAS: 66-27-3) obtido da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) foi administrado via intraperitoneal na dose de 40 mg/kg p.c. Todos os demais reagentes empregados foram de grau analítico.

3.3 Experimentos *In vitro*

3.3.1 Cultura de células HepG2

A linhagem celular HepG2, de hepatocarcinoma humano, obtida da ATCC (*American Type Culture Collection*), foi cedida pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os estoques celulares foram mantidos em freezer - 80°C, em soro bovino fetal acrescido de 10% de DMSO.

As culturas foram mantidas de acordo com o protocolo proposto por Uhl; Helma; Knasmueller (1999). As células foram cultivadas em frascos de cultura de 75cm², em meio mínimo essencial (Minimum Essential Medium, MEM)

suplementado com 15% de soro bovino fetal, em estufa de CO₂ (5%) a 37°C, até atingirem confluência aproximada de 80%. Após esse período, as culturas foram tratadas com tripsina (0,1%), semeadas 1x10⁵ células/poços em placas de 24 poços, e incubadas por 24 h quando, então, foram lavadas com tampão fosfato salino (phosphate buffered saline ou PBS) e estavam prontas para receber os tratamentos.

3.3.2 Teste de viabilidade celular

A viabilidade das células HepG2 tratadas com LT, cDDP e LT + cDDP, em protocolos de pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento, foi avaliada por meio da análise colorimétrica do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio ou MTT (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (MOSMANN, 1983) a qual representa a taxa de respiração mitocondrial das células. Após o período de exposição (24 h) das células aos diferentes tratamentos (LT 0,1; 1,0; 5,0; 10; 25,0; 50 e 100 µM; cDDP 1,0; 5,0 e 10 µM e LT 0,1; 1,0 e 10 µM + cDDP 10 µM) o meio foi aspirado e as células incubadas por mais 3h em 150 µL de meio sem soro + 300 µL de solução de MTT. Em seguida, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido com cuidado para não aspirar o formazan precipitado que foi ressuspensionado em 200 µL de DMSO. A viabilidade celular foi avaliada por espectrofotometria no Leitor Universal de ELISA (ELX 800, Bio-Tek Instruments, USA), no comprimento de onda de 570 nm sendo realizadas 8 repetições por placa em triplicata para cada tratamento.

3.3.3 Tratamentos das células

As culturas foram divididas em dois grupos experimentais com as concentrações estabelecidas a partir dos resultados obtidos no teste de viabilidade celular: a) na genotoxicidade foram testadas três concentrações da LT (0,1; 1,0 e 10 µM); b) na antigenotoxicidade as três doses de LT foram associadas à cDDP (1,0 µM). Nos protocolos de antigenotoxicidade utilizamos pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento como apresentado abaixo (Figura 8). Como controle negativo foi utilizado DMSO (1% em meio de cultura).

Ao final dos tratamentos as células foram coletadas e uma pequena amostra utilizada para a análise de citotoxicidade pelo método do azul de tripan (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Para a realização do ensaio cometa, foram misturados 20 µL da suspensão celular + 180 µL de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting*

point ou LMP) e seguiu-se o protocolo do ensaio cometa alcalino como descrito por Singh *et al.* (1988) e de acordo com protocolo proposto por Tice *et al.* (2000).

Os cometas gerados pela técnica foram analisados em microscópio de fluorescência Zeiss, usando filtro 515 – 560 nm e barreira de filtro de 590 nm, em objetiva de 40X, fotografados com câmera AxioCan (Zeiss) pelo programa AxioVision 3.1 (Zeiss) e analisados por software TriTek Comet Score™ Freeware v 1.5. Foi avaliada a porcentagem de DNA na cauda (% DNA) como parâmetro de danos e de efeitos protetores.

Figura 8: Protocolo experimental para análise *in vitro* da genotoxicidade e antigenotoxicidade da luteína por meio do ensaio cometa. SIM: tratamento simultâneo com luteína e cisplatina; PRÉ: pré-tratamento com luteína seguido de tratamento com cisplatina; PÓS: tratamento com cisplatina seguido de tratamento com luteína.

3.3.4 Dosagem de ER, GSH e cit-c em cultura de células HepG2

A dosagem de ER e cit-c avaliadas neste experimento foram realizadas de acordo com os experimentos desenvolvidos por Sathishkumar *et al.* (2009) e as concentrações de GSH utilizando o reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico ou DTNB) (ELLMAN, 1959). Para os três parâmetros, as

concentrações de LT foram 0,1; 0,5; 1,0; 10 e 25 μM e as de cDDP foram 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10 μM . Todos os experimentos foram realizados em triplicata, no “Laboratório de Lesões em Biomoléculas” do Prof. Dr. Paolo Di Mascio no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP- São Paulo).

3.3.4.1 Dosagem de ER

A geração de ER nas células HepG2 foi determinada utilizando uma sonda intracelular não-específica de ER, a CM-H₂DCFDA (diacetato de 2,7-dicloro-dihidrofluoresceína) (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil). As células HepG2 foram cultivadas em placas de 24 poços onde foram acrescidos 10 μM de CM-H₂DCFDA em tampão Krebs–Ringer–Hepes (KRH - 131 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM MgSO₄, 1,3 mM CaCl₂, 0,4 mM KH₂PO₄, 6 mM glicose, 20 mM Hepes, pH 7,4) por 30 min a 37°C. Após essa incubação, as culturas foram lavadas duas vezes com o tampão KRH e, então, tratadas.

A construção da curva de formação de CM-DCF (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) intracelular foi acompanhada usando um leitor de microplaca (Tecan-infinity) com comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente de 485 e 538 nm. Os níveis de CM-DCF das células não tratadas foram subtraídos dos valores obtidos nos tratamentos. Os resultados foram expressos como o aumento na fluorescência em unidades arbitrárias para as células tratadas em relação às células não tratadas.

3.3.4.2 Avaliação das concentrações de GSH

As culturas de células HepG2 foram tratadas com tripsina e ressuspendidas em 0,5 mL de PBS. Foram adicionados 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, o material foi centrifugado e o sobrenadante misturado à solução tampão A (0,1 M de fosfato de sódio, 5 μM de EDTA, 0,6 mM DTNB e 0,2 mM de NADPH) e tampão B (10 U/mL glutationa redutase em 0,1 M tampão fosfato de sódio). A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC) no comprimento de onda de 412 nm.

As concentrações de GSH nas células HepG2 foram determinadas por meio da construção de uma curva usando a glutationa reduzida como padrão (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). O conteúdo de proteína nas células foi determinado usando o padrão de albumina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) de soro fetal

bovino, segundo método proposto por Bradford (1976). Os resultados foram expressos por nanomol de GSH por miligrama de proteína (nmol/mg proteína).

3.3.4.3 Quantificação da liberação de cit-c

Depois do tratamento, as células foram fracionadas usando o kit de fracionamento mitocôndria/citosol da BioVision (Mountain View, CA, USA). Foram semeadas 1×10^6 células e lavadas duas vezes com PBS gelado, centrifugadas, e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de tampão de extração gelado contendo 1,4-dithiothreitol (DTT) e inibidores de proteases. As células foram, então, rompidas usando homogenizador Dounce (30 agitações) em gelo, lisadas e centrifugadas a 17.500 rpm por 30 min a 4°C. O sobrenadante (fração citosólica) foi coletado e o cit-c foi quantificado nessa fração usando kit ELISA (Quantikine rat/mouse - R&D Systems). A fração citosólica foi adicionada à placa de 96 poços pré-corada com anticorpo monoclonal de rato, específico para citc-c. O cit-c ligado ao anticorpo é detectado usando um segundo anticorpo monoclonal (conjugado a *Horse radish peroxidase* ou peroxidase de raiz forte).

Depois da remoção do anticorpo não conjugado, soluções de tetrametilbenzidina e H_2O_2 foram adicionadas aos poços. A reação foi terminada com acidificação com HCl e a extensão da formação de cromóforos foi quantificada usando leitor de microplaca (Tecan) no comprimento de onda de 450 nm. O total de cit-c presente nas amostras foi determinado pela leitura obtida nas amostras comparada à curva padrão. Os resultados foram expressos por nanogramas de cit-c por 10^6 células (ng/ 10^6 células).

3.4 Experimentos *In vivo*

3.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*), com aproximadamente 30 g de peso corpóreo, provenientes do Biotério Central da Coordenadoria do Campus Administrativo de Ribeirão Preto, mantidos em grupos de 4 animais em caixas de polietileno com tampa grade, de acordo com as recomendações do *Canadian Council on Animal Care* (OLFERT; CROSS; MCWILLIAM, 1993). Para todos os tratamentos foram usados 4 machos e 4 fêmeas, no entanto para nenhum dos testes empregados houve diferença estatística entre os sexos (dados não mostrados). Por esse motivo, todos os dados são apresentados

por grupo completo (machos e fêmeas) para facilitar a apresentação dos resultados. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto (Protocolo No. 06.1.909.53.7 – ANEXO 1).

3.4.2 Tratamento dos animais

O delineamento dos experimentos realizados *in vivo* (Figura 9) seguiu as metodologias otimizadas e usualmente utilizadas em nosso grupo (ANTUNES; TAKAHASHI, 1998; ANTUNES *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2010) e também demonstradas na literatura (AZEVEDO *et al.*, 2007). Os animais receberam a LT e a CLb via gavagem, na proporção de 0,1 mL de solução para cada 10 g de peso corpóreo (em média 0,3 mL por animal) uma vez ao dia, durante 13 dias, além de água e alimento *ad libitum*. As doses utilizadas foram estabelecidas a partir de dados da literatura sobre ingestão diária, estudos de toxicidade e quantificação dos dois pigmentos em compostos da dieta (SHAO; HATHEOCK, 2006; BOHN; WALCZYK, 2004).

Este estudo adequou a via de administração ao modo como normalmente os compostos são recebidos, sendo o quimioterápico administrado via intraperitoneal e os pigmentos naturais via oral, como os compostos da dieta (HARTMANN *et al.*, 2003). Os grupos receberam tratamentos com OM, LT e CLb via gavagem e cDDP ou salina via intraperitoneal da seguinte forma:

- a) Grupo 1: OM durante 13 dias e salina no 14º dia.
- b) Grupo 2: OM durante 13 dias e cDDP no 14º dia.
- c) Grupos 3 e 4: LT (0,2 ou 0,5 mg/kg p.c.) durante 13 dias e salina no 14º dia.
- d) Grupos 5 e 6: LT (0,2 ou 0,5 mg/kg p.c.) durante 13 dias e cDDP no 14º dia.
- e) Grupos 7 e 8: CLb (0,2 ou 0,5 mg/kg p.c.) durante 13 dias e salina no 14º dia.
- f) Grupos 9 e 10: CLb (0,2 ou 0,5 mg/kg p.c.) durante 13 dias e cDDP no 14º dia.
- g) Grupo 11: Combinação das doses de 0,5 mg/kg p.c. da LT e 0,5 mg/kg p.c. de CLb durante 13 dias e salina no 14º dia. As doses utilizadas na mistura foram estabelecidas de acordo com os resultados obtidos na avaliação prévia dos pigmentos isolados.
- h) Grupo 12: Combinação das doses de 0,5 mg/kg p.c. da LT e CLb durante 13 dias e cDDP no 14º dia.

Figura 9: Delineamento experimental dos estudos realizados *in vivo* com os pigmentos luteína e clorofila b isolados e em combinação.

Os animais foram pesados no início e no fim dos experimentos para detectar possíveis alterações na massa corpórea devido aos tratamentos administrados. Os rins e o fígado também foram pesados após eutanásia, para estabelecer a relação entre massa do órgão/massa corpórea.

Ao final dos experimentos (15º dia), todos os animais foram previamente anestesiados com hidrato de cloral (10%) dissolvido em NaCl 0.9% e foram submetidos à eutanásia por decapitação para coleta do material biológico. A decapitação foi necessária para a coleta de quantidade suficiente de sangue total utilizado na análise dos parâmetros bioquímicos.

3.4.3 Ensaio cometa em células do sangue periférico, rim e fígado

O ensaio alcalino cometa foi realizado como descrito por Singh *et al.* (1988) e de acordo com protocolo proposto por Tice *et al.* (2000) e foi procedido da seguinte forma: o sangue periférico foi coletado da veia caudal com a ajuda de agulha de insulina em tempos diferentes durante o experimento: 4h após o primeiro tratamento (realizado no 1º dia com OM, LT ou CLb) e 4h após a injeção intraperitoneal do 14º dia (salina, cDDP ou MMS) já que esse material permite o acompanhamento de dados durante o experimento. As lâminas foram preparadas com 17 µL do sangue + 180 µL de agarose LMP. Amostras de rim e fígado foram coletadas ao final do experimento (15º dia), 24 horas após a injeção intraperitoneal de salina, cDDP ou MMS. Aproximadamente 0,4 g de tecido foram picotados em 1800 µL de solução de Hanks + 200 µL de DMSO e depois filtrados através de gases. O preparo das lâminas foi realizado com 80 µL do filtrado + 240 µL de agarose LMP. As etapas seguintes do ensaio cometa (lise, desnaturação do DNA, eletroforese e neutralização) tanto para o sangue periférico como para os órgãos seguiram o protocolo proposto por Tice *et al.* (2000).

Foram confeccionadas duas lâminas por animal em cada tratamento e coradas com brometo de etídeo (0,2 mg/mL). A análise dos cometas gerados pela técnica foi realizada de forma diferente da previamente descrita para os tratamentos *in vitro*. A análise foi realizada utilizando-se o software Komet 6.0 (Andor) no “Laboratório de Lesões em Biomoléculas” do Prof. Dr. Paolo Di Mascio no Instituto de Química em São Paulo, com os resultados também expressos usando a % DNA na cauda.

3.4.4 Teste do micronúcleo em células da medula óssea e sangue periférico

O material da medula óssea foi coletado no 15º dia e o teste do micronúcleo realizado segundo protocolo descrito por Schmid (1975). Foram analisados 2000 eritrócitos policromáticos (PCEs) por animal em microscópio de luz binocular (Zeiss), com objetiva de 100x (imersão), de acordo com os critérios descritos por Titenko-Holland *et al.* (1997) e Huber, Streng e Bauchinger (1983). A determinação da citotoxicidade na medula óssea foi feita por meio da porcentagem de PCE em relação ao total de eritrócitos (PCE + NCE, eritrócitos normocromáticos) (RIBEIRO, 2003).

Para o teste do micronúcleo em células do sangue periférico, no começo dos

experimentos (T0), 36 h após o primeiro tratamento (T1) e no 15º dia (T2), 10 µL de sangue foram coletados da cauda de cada animal, depositados em lâminas previamente preparadas com o corante laranja de acridina (CAS: 10127-02-3, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e cobertos com lamínula, seguindo o protocolo de Hayashi *et al.* (1990). As lâminas foram mantidas em freezer -20°C, por 24 h antes da análise citogenética que foi realizada em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, modelo Axiostar Plus) combinando luz azul (488nm) e filtro amarelo. Foram analisados 1000 reticulócitos por animal e anotadas as frequências de micronúcleos segundo proposto por Hayashi *et al.* (1990).

3.4.5 Dosagem de CAT e GSH no sangue total de camundongos

Grupamentos tióis não-proteicos, sendo a GSH o principal representante, foram determinados no sangue total usando DTNB. Foram hemolisados 300 µL de sangue com 200 µL de Triton X-100 10% e precipitado com 200 µL de TCA 30%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min, e a GSH quantificada pela adição de 50 µL do sobrenadante em 900 µL de tampão Tris (pH 7,0) e 50 µL de DTNB. A concentração da GSH foi calculada por meio de análise colorimétrica em espectrofotômetro (Spectronic Genesys™ 2) usando uma curva padrão de cisteína (Merck S.A., São Paulo, Brasil), de acordo com Ellman (1959).

A atividade da CAT em sangue total foi determinada utilizando a sua capacidade de dismutar H₂O₂ em água e oxigênio. Essa análise foi realizada pela leitura do decaimento do H₂O₂ em espectrofotômetro no ultravioleta com comprimento de onda de 240 nm. O sangue total foi diluído em PBS 50 mM e alíquotas de 20 µL foram adicionadas à 1810 µL desta salina, juntamente com 70 µL de H₂O₂ (10 mM). A atividade da CAT foi monitorada pelo consumo de H₂O₂ em 5 min e os valores foram expressos em κ/gHb (AEBI, 1984). A concentração de hemoglobina (Hb) foi analisada em sangue total por meio do método da cianometahemoglobina utilizando o reagente de Drabkin (TENTORI; SALVATI, 1981), para a correção dos resultados da atividade da CAT.

3.4.6 Análise das concentrações de TBARS e GSH no rim e no fígado de camundongos

As concentrações de TBARS em tecido hepático e renal de camundongos foram determinadas de acordo com Uchiyama e Mihara (1978). Rim ou fígado (0,2 g)

foram homogeneizados em 5,0 mL de KCl 1,15% gelado. Uma alíquota de 0,5 mL do homogeneizado foi misturada com 3 mL de ácido fosfórico 1% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,6%. A mistura foi aquecida por 45 min em banho de água fervente e após resfriamento foram adicionados 4 mL de *n*-butanol e as misturas foram vigorosamente agitadas em vórtex e centrifugadas a 3500 rpm por 10 min. A absorbância da camada orgânica foi medida em 535 e 520 nm e as concentrações de TBARS nas amostras foram determinadas utilizando uma curva padrão feita com 1,1,3,3 tetraethoxypropano em concentrações de 5,16; 10,32; 20,64 e 30,96 nmol/mL. A concentração de TBARS nos tecidos foi expressa em nmol/g de tecido.

Para avaliar as concentrações de GSH, os homogeneizados descritos acima foram diluídos em água (1:4) e precipitados com TCA 50% e, em seguida, centrifugados a 3500 rpm por 10 min (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Um volume de 2,0 mL de tampão Tris-EDTA (0,2 M, pH 8,9) e 0,1 mL de DTNB foram adicionados a uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 15 min e, então, lidas em 412 nm com uma curva padrão de α -cisteína nas concentrações de 10, 20, 40 e 60 nmol/mL. Os resultados foram expressos em nmol GSH/g de proteína. A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Lowry com as amostras lidas em 650 nm (HARTREE, 1972).

3.4.7 RT² Profiler PCR Arrays

Para análise da expressão gênica em células do fígado de camundongos, os animais foram tratados como descrito acima (para os grupos: OM, OM + cDDP, LT 0,5 e LT 0,5 + cDDP) e, após eutanásia, foram removidos os fígados imediatamente cobertos com nitrogênio líquido e armazenados em freezer - 80°C. Os fígados de animais do mesmo grupo de tratamento foram misturados para a confecção de um *pool* de amostras e, a partir deste, foi extraído o RNA e realizada a técnica de RT-qPCR Array.

As amostras de fígado foram submetidas ao procedimento de extração de RNA total segundo protocolo do Kit *SV Total Isolation System* (Promega, Madison, USA), que inclui os passos de lise das células, purificação do RNA, tratamento com DNase e eluição do RNA com água livre de nuclease fornecido pelo fabricante.

Para a quantificação das amostras de RNA total, uma alíquota de 3 μ L foi diluída em 297 μ L de água livre de nuclease. A quantificação do RNA total foi realizada por leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 260 nm, sendo

a quantidade de RNA total dada pela multiplicação do valor de absorbância a 260 nm pelo fator 40, o que permite a estimativa da concentração de RNA total em µg/mL. O grau de pureza das soluções de RNA foi avaliado pelas razões $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$. Uma solução pura de RNA apresenta razão $A_{260/280}$ em torno de 2,0, razões inferiores a 1,7 são indicativas de contaminação por proteínas. A razão $A_{260/230}$ pode variar de 1,8 a 2,2, razões inferiores podem indicar contaminação com guanidina e/ou fenol.

A integridade do RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose com formaldeído (gel desnaturante). Às amostras desnaturadas foram acrescentados 2 µL de *dye loading solution* e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada a 80 V durante 90 min e em seguida foram visualizadas e fotografadas em transiluminador UV.

Todo o processo seguinte de confecção do cDNA e PCR em tempo real, bem como a análise estatística dos resultados foram realizados de acordo com o protocolo da “SABiosciences RT² Profiler PCR Arrays”. Placas de PCR Array para análise de genes relacionados ao estresse oxidativo e defesa antioxidante (*The Mouse Oxidative Stress and Antioxidant Defense RT² Profiler™* PCR Array) foram utilizadas em triplicata para o *pool* de amostras de tecido hepático. Os 84 genes avaliados por essa metodologia podem ser visualizados no Anexo 2.

3.5 Análise Estatística

Todos os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Para todos os parâmetros avaliados a análise estatística utilizada foi ANOVA uma via seguida pelo teste de Dunnett com $p < 0,05$ no programa Graph Pad Prism 5. Para os testes de genotoxicidade e mutagenicidade, os grupos foram comparados com o controle negativo. Para os testes de antigenotoxicidade e antimutagenicidade os grupos foram comparados com o controle positivo. Nas avaliações bioquímicas os tratamentos foram comparados com o respectivo controle (negativo ou positivo).

Diferenças na expressão gênica foram avaliadas por meio do test t de Student. Nessa análise estatística foram comparados o grupo controle (OM) com cada um dos grupos experimentais (MO + cDDP, LT e LT + cDDP) usando o valor médio de C_t obtido das amostras em triplicatas. O valor de significância estatística foi $p < 0,05$ e somente os genes que tiveram *fold change* ≥ 2 foram considerados diferencialmente expressos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1 Experimento 1: Testes *in vitro* para a avaliação da genotoxicidade e atividade antioxidante da LT em células HepG2.

Os estudos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos estudos *in vivo*, tais como: facilidade para padronizar as condições experimentais (temperatura, pH, composição do meio de cultura) devido ao material ser relativamente uniforme em seus requisitos metabólicos e em seu comportamento; possibilidade de tratamentos das células em várias fases do ciclo celular; economia e boa reprodutibilidade e apresentação de organização dos cromossomos e do seu DNA idênticas às células *in vivo* (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991). A linhagem de células HepG2 é uma das mais utilizadas por reter a atividade das enzimas metabolizadoras (KNASMULLER *et al.*, 1998; WINTER *et al.*, 2008; FOWLER *et al.*, 2012). Essa linhagem vem sendo utilizada em experimentos com compostos isolados e misturas complexas, principalmente, em estudos de antimutagenicidade (DAUER *et al.*, 2003; BARCELOS *et al.*, 2009; ANGELI *et al.*, 2010).

Os primeiros experimentos deste estudo de avaliação da genotoxicidade e dos efeitos protetores da LT *in vitro* foram para estabelecer as concentrações a serem avaliadas no ensaio cometa. O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul arroxeadado (formazan). A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória, mostrando que as células estão viáveis. Desde a descrição original do teste do MTT por Mosmann (1983), ele tem sido amplamente utilizado em experimentos com células em cultura para a avaliação da viabilidade celular e o estabelecimento de concentrações.

Os resultados do teste do MTT (Figura 10) mostraram que mesmo baixas concentrações da cDDP são capazes de diminuir significativamente a viabilidade celular (Figura 10a). O mesmo foi observado para concentrações acima de 25 µM do carotenoide LT (Figura 10b). Para avaliar se a LT era capaz de impedir a diminuição da viabilidade celular induzida pela cDDP, a dose de cDDP 10 µM (que diminuiu a viabilidade em relação ao controle negativo) foi associada à três doses de LT (0,1; 1,0 e 10 µM). A associação dos dois compostos mostrou que a LT, em protocolos de pré-tratamento e tratamento simultâneo, aumenta a viabilidade em relação ao controle positivo (cDDP 10 µM), no entanto, esse efeito protetor não foi observado

no protocolo de pós-tratamento, no qual a viabilidade encontrada foi ainda menor do que no tratamento somente com a cDDP (Figura 10c). Nossos dados obtidos com o teste do MTT levaram a escolha da concentração de 1 μM de cDDP (concentração não citotóxica) para ser usada como controle positivo nos testes de genotoxicidade e indutora de danos nos testes de antigenotoxicidade. Considerando que as concentrações de LT no plasma humano e nos tecidos, após ingestão por meio da dieta, ficam em torno de 0,3 μM (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), as três menores concentrações não citotóxicas da LT (0,1, 1 e 10 μM) e próximas aos níveis plasmáticos, foram escolhidas para serem avaliadas quanto a genotoxicidade e possíveis efeitos protetores frente aos danos induzidos pela cDDP.

Figura 10: Porcentagem de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) viáveis no teste de viabilidade celular (MTT). O grupo controle negativo representa 100% de células viáveis. Viabilidade celular após tratamento a) cDDP em diferentes concentrações, b) LT em diferentes concentrações e c) cDDP (10 μM) + LT (0,1; 1,0 e 10 μM). Na avaliação dos efeitos protetores da LT contra a redução da viabilidade celular induzida pela cDDP (c), a LT foi administrada antes (PRE), em conjunto (SIM) e após (PÓS) a administração da cDDP. LT: luteína (μM), cDDP: cisplatina (μM). * Estatisticamente diferente do controle negativo. # Estatisticamente diferente do controle positivo. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p < 0,05$).

As três concentrações de LT avaliadas no ensaio cometa mostraram ausência de efeito genotóxico em células HepG2 após tratamento de 3 h, isto porque os valores obtidos para % de DNA na cauda (Figura 11) foram semelhantes ao controle negativo (Figura 11a). No grupo tratado com cDDP, observou-se uma diminuição significativa na migração do DNA em relação ao controle negativo nos três protocolos de tratamento utilizados, pré (Figura 11b), simultâneo (Figura 11c) e pós-tratamento (Figura 11d). Na associação do quimioterápico com a LT, observou-se que o padrão de migração do DNA se manteve igual ao controle negativo nos protocolos de pré-tratamento e tratamento simultâneo. No protocolo de pós-tratamento a associação mostrou resultados estatisticamente iguais ao controle positivo.

Figura 11: Porcentagem de DNA na cauda (% DNA) no ensaio cometa em células de hepatocarcinoma humano (HepG2). cDDP: cisplatina (µM); LT: luteína (µM); controle: DMSO 1%. a) genotoxicidade, b) antigenotoxicidade pré-tratamento, c) antigenotoxicidade tratamento simultâneo e d) antigenotoxicidade pós-tratamento. *Estatisticamente diferente do controle negativo. **Estatisticamente diferente do controle positivo. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Resultados negativos foram obtidos para genotoxicidade da LT e um padrão diferente de migração do DNA foi obtido para a cDDP nos três protocolos de

tratamento utilizados. Os resultados obtidos com a cDDP eram esperados uma vez que Pang *et al.* (2007) avaliando complexos de platina com atividade anticancer e Wozniak, Czechowska e Blasiak (2004), testando os efeitos moduladores do inibidor de tirosina quinase STI571, também observaram um decréscimo no *Olive Moment* e no tamanho da cauda, respectivamente, usando concentrações semelhantes de cDDP. Mendonça *et al.* (2010) também demonstraram que, em cultura de células PC12, a cDDP diminui a migração do DNA em relação ao controle negativo. O decréscimo na migração do DNA é esperado, pois a toxicidade dos compostos contendo platina está atribuída à formação de *crosslinks* proteína-DNA e *crosslinks* intracadeias e intercadeias de DNA (RAJSKI; WILLIAMS, 1998). Os *crosslinks* 1,2-intracadeia (GG e AG) são os mais freqüentes (cerca de 80%) seguidos pelos *crosslinks* 1,3-intracadeia (10%) e os aductos monofuncionais (2 a 3 %) (BARTEL *et al.*, 2012). Tanto os *crosslinks* DNA-DNA como DNA-proteína reduzem a capacidade do DNA de migrar no gel de agarose tornando a quantidade de DNA na cauda menor até mesmo que no controle negativo (TICE; STRAUSS, 1995).

De acordo com Gebicki e Gebicki (1999) e Luxford, Dean e Davies (2002), aminoácidos e proteínas oxidados podem, espontaneamente, iniciar a ligação ao DNA formando *crosslinks*. A indução de dano oxidativo à proteína por dióxido sulfúrico também está associada à formação de *crosslinks* DNA-proteína (XIE; FAN; MENG, 2007). Li *et al.* (2008) mostraram que a acroleína causa quebras no DNA e *crosslinks* DNA-proteína e usando parâmetros como a dosagem de ER, bases oxidadas e níveis de GSH, eles conseguiram correlacionar estresse oxidativo com aumento na formação de *crosslinks* e, conseqüentemente à diminuição na migração do DNA no ensaio cometa.

Considerando essas evidências entre a relação do estresse oxidativo e a formação de *crosslinks* (COLLINS *et al.*, 2005), é esperado que a adição de um composto que apresente atividade antioxidante possa diminuir o estresse oxidativo e evitar a oxidação de macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, diminuindo a formação de *crosslinks*. Wozniak, Czechowska e Blasiak (2004) observaram que a adição de um antioxidante em associação com a cDDP aumentou o tamanho da cauda em relação ao tratamento somente com o antitumoral, obtendo valores semelhantes ao controle negativo, o que está de acordo com os nossos resultados.

Os protocolos de tratamentos empregados no ensaio cometa fornecem ainda mais evidências sobre as propriedades antioxidantes da LT. Protocolos de pré-

tratamento e tratamento simultâneo com LT e cDDP mostraram uma migração do DNA similar ao grupo controle negativo, o que não foi observado para o protocolo de pós-tratamento. Esses efeitos protetores da LT mostraram que este carotenoide poderia exercer um papel na indução de enzimas do biometabolismo, como as famílias citocromo e glutathione (KADA; INOUE; NAMIKI, 1982; KURODA *et al.*, 1992).

De Flora e Ramel (1988) propuseram uma classificação para os antimutágenos e anticarcinógenos que vem sendo constantemente revisada (DE FLORA, 1998; DE FLORA *et al.*, 2001; DE FLORA; FERGUSON, 2005) e é, atualmente, mais utilizada para classificação desses compostos. De acordo com esses autores, os antimutágenos atuam na prevenção primária, tendo o objetivo de prevenir a ocorrência do câncer por meio da inibição das mutações, tanto no ambiente intra como extracelular. Independente da classificação utilizada para os antimutágenos, nossos resultados destacam o efeito da LT como agente capaz de prevenir o aparecimento das lesões no DNA, uma vez que o mesmo efeito protetor não foi observado em pós-tratamento, após a indução das lesões pelo quimioterápico.

A fim de investigar se a LT, quando associada à cDDP, muda os padrões de migração do DNA em relação ao tratamento somente com cDDP devido à sua capacidade antioxidante, neste trabalho foram avaliados três parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo com protocolo de tratamento simultâneo, onde a cDDP e a LT foram adicionadas conjuntamente nas culturas: concentração de GSH, quantificação de ER e liberação de cit-c.

Os resultados da dosagem de GSH (Figura 12) mostraram que a cDDP, na concentração de 1,0 μM , e no tempo de tratamento (3 h), mesmas condições utilizadas nos experimentos de genotoxicidade, é capaz de diminuir significativamente as concentrações do antioxidante GSH (Figuras 12 a e b). A cDDP reage com os grupos sulfidríla, como os presente na glutathione, e a diminuição nas concentrações intracelulares de GSH está ligada à detoxificação da cDDP (BOULIKAS *et al.*, 2007). Olas, Nowak e Wachowicz (2004) já haviam demonstrado que compostos de platina causam, no sangue periférico, um decréscimo da GSH e dos tióis de cisteína livres.

Figura 12: Dosagem de glutathiona reduzida (GSH) em nmol/mg de proteína após tratamento de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) com a) cisplatina (cDDP) em diferentes concentrações, b) cDDP (1,0 μM) em diferentes tempos de amostragem e c) cDDP (1,0 μM) associada às diferentes concentrações de luteína (LT). *Estatisticamente diferente do controle negativo. #Estatisticamente diferente do controle positivo. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Quando associamos a LT ao tratamento com a cDDP (Figura 12c), nossos resultados mostraram a capacidade da LT em restabelecer as concentrações de GSH depletadas pela cDDP. Esse fato foi previamente reportado por Muriach *et al.* (2008) porém, estudando os efeitos de altas concentrações de glicose como indutoras de estresse oxidativo, e mostraram que a LT, na concentração de 20 μM, foi capaz de restabelecer as concentrações de GSH, nesse caso diminuídos pelo excesso de glicose.

Para corroborar os dados sobre a atividade antioxidante da LT, mais duas dosagens bioquímicas foram realizadas: a dosagem de ER (Figura 13) e a liberação de cit-c, que está associada à produção de ER (Figura 14). Os resultados mostraram

que, novamente, a cDDP foi capaz de induzir a formação de ER na concentração e no tempo de tratamento utilizados nesse estudo na avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade no ensaio cometa. As diferentes concentrações de LT associadas à cDDP foram capazes de diminuir a quantidade de ER, destacando mais uma vez suas propriedades antioxidantes. Nossos resultados mostraram também que a cDDP aumenta a liberação de cit-c, um indicativo de indução do processo apoptótico, e que a LT é capaz de, efetivamente, diminuir essa liberação em concentrações maiores do que 1 μ M.

Figura 13: Dosagem de espécies reativas (ER) em unidades relativas de fluorescência após tratamento de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) com a) cisplatina (cDDP) em diferentes concentrações, b) cDDP (1,0 μ M) em diferentes tempos de amostragem e c) cDDP (1,0 μ M) associada às diferentes concentrações de luteína (LT). *Estatisticamente diferente do controle negativo. #Estatisticamente diferente do controle positivo. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Figura 14: Dosagem de citocromo-c (cit-c) em ng/10⁶ células após tratamento de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) com a) cisplatina (cDDP) em diferentes concentrações, b) cDDP (1,0 μM) em diferentes tempos de amostragem e c) cDDP (1,0 μM) associada às diferentes concentrações de luteína (LT). *Estatisticamente diferente do controle negativo. #Estatisticamente diferente do controle positivo. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos nos três parâmetros avaliados de estresse oxidativo mostraram que a dose de 1,0 μM de cDDP, em tratamento de 3 h, tempo empregado no ensaio cometa, foi capaz de depletar os níveis de GSH, induzir a formação de ER e induzir a liberação de cit-c. A associação da cDDP com diferentes concentrações de LT forneceu uma evidência clara da atividade antioxidante desse carotenoide.

A sonda CM-H₂DCFDA utilizada neste estudo, apesar de inespecífica por reagir com diferentes tipos de ER, possibilita uma visão geral do estado redox da célula o que a torna uma importante ferramenta nas investigações iniciais de compostos oxidantes e/ou antioxidantes (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010). Nakajima *et al.* (2009) usando a mesma sonda mostraram que o pré-tratamento com

zeaxantina *in vitro* durante 20 minutos (1,0 - 100 μ M) foi capaz de diminuir, de forma dose-dependente, a quantidade de ER na célula induzida pela estaurosporina. A zeaxantina e a LT são isômeros e são os maiores constituintes da região da mácula na retina (BONE; LANDRUM, 1992). Nossos resultados mostraram que, nas mesmas concentrações utilizadas por Nakajima *et al.* (2009) para zeaxantina, o seu isômero LT apresentou efeito de sequestro de ER induzidas pela cDDP em células HepG2. Santocono *et al.* (2007) também mostraram efeito antioxidante da LT sobre ERNs, no entanto, utilizaram um ensaio de interação entre carotenoide e peroxinitrito, um ensaio menos específico que não leva em conta o metabolismo celular.

Outro marcador de estresse oxidativo é a liberação de cit-c (FERRARI, 2000), um passo central no início do processo apoptótico caspase-dependente (TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2000; SCORRANO; KORSMEYER, 2003). Uma das mais importantes razões para isso é que uma grande quantidade de Ca^{2+} ou ER é gerada antes da liberação do cit-c resultando no subsequente desarranjo da sinalização celular e das funções mitocondriais, bem como a destruição de componentes celulares por enzimas ativadas pelo Ca^{2+} e pelas ER (AN; CHEN; HUANG, 2004). Desse modo, compostos capazes de reduzir a formação de ER, consequentemente, são capazes de diminuir a liberação de cit-c, bloqueando a apoptose. Não há dados disponíveis sobre carotenoides prevenindo a liberação de cit-c. Nossos primeiros resultados demonstraram que o efeito antioxidante da LT tem um importante papel na diminuição da formação de ER e também na diminuição do processo apoptótico iniciado por desbalanço no estado redox da célula.

Em resumo (Figura 15), nossos estudos mostram que a cDDP induz a formação de ER que estão relacionadas com a formação de *crosslinks* de DNA em células HepG2 e com alteração nos parâmetros bioquímicos que refletem o estado redox da célula como a concentração de GSH e a liberação de cit-c. Apesar do tratamento com a LT ter diminuído de forma significativa a formação de ER e a liberação do cit-c induzidas pela cDDP, esses valores não foram restabelecidos ao ponto de atingir os níveis encontrados no controle negativo. Somente as concentrações de GSH foram totalmente restabelecidas no tratamento associando a LT e a cDDP. Além disso, foi demonstrado que o tratamento com o carotenoide LT presente na dieta, quando associado à cDDP, diminuiu a formação de ER e,

consequentemente, a formação de *crosslinks*, além de manter o estado redox da célula.

Figura 15: Representação dos efeitos biológicos encontrados para a cisplatina e a luteína em cultura de células de hepatocarcinoma humano (HepG2). ER: espécies reativas, GSH: glutathiona, cit-c: citocromo-c.

4.2 Experimento 2: Avaliação *in vivo* da genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos protetores da LT em células da medula óssea, rim, fígado e sangue periférico de camundongos, além da avaliação da capacidade antioxidante da LT no sangue periférico, por meio da dosagem de GSH, atividade da CAT e da dosagem de TBARS e GSH em rim e fígado.

Os testes *in vivo* são importantes na avaliação dos riscos de genotoxicidade e mutagenicidade porque permitem a consideração de aspectos envolvidos na metabolização da substância em estudo de forma mais completa que sistemas *in vitro* e a administração da mesma por diferentes vias em tratamentos agudos e crônicos (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

A melhor forma de escolha dessas vias de administração dos compostos a serem avaliados é descrita por Hartmann *et al.* (2003), que fornece recomendações para a realização do ensaio cometa, e diz que a forma ideal de administração de um composto é a que se assemelha à sua via normal de exposição. Nos estudos *in vivo*, a seleção prévia das doses também é de extrema importância para o entendimento dos resultados. Shao e Hathcock (2006) fornecem uma completa revisão sobre a

avaliação de risco da LT. Kruger *et al.* (2002) demonstraram que ratos tratados com doses diárias de até 639 mg/kg p.c de LT não apresentaram qualquer sinal de toxicidade. Além da literatura, a concentração desse carotenoide em vegetais verdes também foi considerada para a escolha das doses neste estudo. Segundo Lienau *et al.* (2003), até 12,12 mg de LT pode ser obtida de 100 g de espinafre, o que representa uma quantidade adequada ao consumo diário de um adulto. A partir desses trabalhos, foram escolhidas duas doses não tóxicas (0,2 e 0,5 mg/kg p.c) para a realização dos experimentos *in vivo*, sendo equivalentes a 10 e 30 mg/dia para um adulto.

A cDDP é um potente agente quimioterápico, especialmente utilizado no tratamento de tumores sólidos tais como testículo e ovário, câncer de cabeça e pescoço e pulmão (SERKIES; WEGRZYNOWICZ; JASSEM, 2011; MONTAGNANI *et al.*, 2011). O efeito terapêutico da cDDP torna-se maior com o aumento da dose, porém a terapia com altas doses é limitada pelos efeitos adversos dos quais a toxicidade renal é o mais grave (MEYER; MEDIAS, 1994). Estudos prévios realizados em nosso laboratório já demonstraram o efeito mutagênico (ANTUNES *et al.*, 2000; ANTUNES *et al.*, 2005), a nefrotoxicidade (ANTUNES; DARIN; BIANCHI, 2001; DO AMARAL *et al.*, 2008) e a hepatotoxicidade (MARTINS *et al.*, 2008) da cDDP. Considerando estes resultados já obtidos em nosso laboratório, a cDDP foi utilizada como indutor de danos nos experimentos *in vivo*.

Os primeiros parâmetros avaliados neste estudo foram as variações de massa corpórea e as relações entre massa de rim/massa corpórea e massa do fígado/massa corpórea. Em experimentos de avaliação toxicológica, a comparação entre a massa dos órgãos e as massas corpóreas nos grupos tratados e não tratados é usada para prever efeitos tóxicos do composto teste e para identificar possíveis órgãos-alvo mais afetados pela exposição (WOLFSEGGGER *et al.*, 2009). As massas dos órgãos são usualmente expressas como valores relativos (expressos como a porcentagem em relação à massa corporal). Os resultados são mostrados na Tabela 1, e nenhuma diferença estatística foi observada entre os tratamentos, para qualquer parâmetro avaliado.

Tabela 1: Variação de massa corporal durante o tratamento, expressos em gramas e porcentagem (%), e relações entre a massa do rim/massa corporal e a massa do fígado/massa corporal nos diferentes tratamentos (n=8)

Tratamentos	Massa inicial	Massa final	Ganho de massa em gramas e %	Massa rim/ massa corporal	Massa fígado/ massa corporal
OM	29,3 ± 3,3	31,5 ± 4,1	2,2 ± (7,5%)	1,5 ± 0,2	5,23 ± 0,5
OM + cDDP	29,2 ± 1,0	30,0 ± 1,0	0,8 ± (2,8%)	1,4 ± 0,2	5,30 ± 0,3
LT 0,2	28,0 ± 1,0	29,9 ± 2,3	1,9 ± (6,8%)	1,3 ± 0,2	4,86 ± 0,8
LT 0,5	31,2 ± 2,1	32,0 ± 1,0	0,8 ± (2,6%)	1,4 ± 0,2	5,22 ± 0,7
LT 0,2 + cDDP	30,4 ± 2,2	32,0 ± 2,0	1,6 ± (5,3%)	1,4 ± 0,2	5,00 ± 0,4
LT 0,5 + cDDP	30,9 ± 2,3	32,1 ± 3,1	1,2 ± (3,9%)	1,3 ± 0,2	5,20 ± 0,3

OM: óleo mineral, LT: luteína, cDDP: cisplatina. Não houve diferença estatística entre os grupos. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p > 0,05$).

Para a realização do ensaio cometa é necessária a avaliação da viabilidade celular. Em nossos experimentos, foi utilizado o método azul de tripan e a viabilidade no sangue periférico foi de 100% e nos tecidos renal e hepático foi superior a 80% em todos os experimentos. O grupo MMS foi adicionado somente para comprovar a sensibilidade do ensaio cometa, uma vez que o controle positivo (cDDP) não aumentou a % de DNA na cauda.

Os resultados obtidos no ensaio cometa em sangue periférico dos camundongos não mostraram qualquer diferença estatística entre os grupos no primeiro tempo de amostragem (4 h após o primeiro tratamento) (Figura 16). No entanto, a cDDP diminuiu a migração do DNA em relação ao controle negativo no segundo tempo de amostragem (4 h após a administração da cDDP no 14º dia). Os resultados obtidos em células do fígado e rim de camundongos coletadas ao final do experimento (24 h após a injeção intraperitoneal de salina ou cDDP) mostraram que, assim como observado para as células do sangue periférico, as duas doses de LT não alteraram a migração do DNA em relação ao grupo controle negativo (OM) mostrando ausência de efeito genotóxico e os animais que receberam cDDP apresentaram redução na % DNA na cauda.

O pré-tratamento dos animais com o carotenoide LT resultou na diminuição da formação de *crosslinks*, uma vez que, nos grupos que receberam LT 0,2 ou LT 0,5 mg/kg p.c. associada à cDDP, a migração do DNA não apresentou diferenças em

relação ao controle negativo, como observado no tratamento com a cDDP isolada. Portanto, nos três tecidos avaliados, a LT mostrou efeito antigenotóxico, diminuindo a formação dos *crosslinks* em relação ao grupo controle positivo (cDDP).

Figura 16: Porcentagem de DNA na cauda (% DNA) no ensaio cometa no sangue periférico 4 h após o primeiro tratamento (SP T0) e 4 h após a injeção de salina, cDDP ou MMS (SP T1), no fígado e no rim de camundongos (15º dia). OM: óleo mineral, LT: luteína, cDDP: cisplatina, MMS: metil metano sulfonato, SP: sangue periférico. *Estatisticamente diferente do controle negativo. #Estatisticamente diferente do controle positivo (OM + cDDP). ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Apesar dos poucos relatos do uso da cDDP no ensaio cometa, resultados mais consistentes são relatados para estudos realizados *in vitro*, os quais comprovam o papel do estresse oxidativo na indução de *crosslinks* e diminuição da migração do DNA pela cDDP (GEBICKI; GEBICKI, 1999; LUXFORD; DEAN; DAVIES, 2002; LI *et al.*, 2008).

Nessler *et al.* (2007) e Sasaki *et al.* (2000) realizaram o ensaio cometa em células renais de ratos e os resultados demonstraram diminuição da média do “*Olive Moment*” administrando cDDP via intraperitoneal e oral, respectivamente, na mesma dose empregada neste estudo. Nossos resultados corroboram esses estudos prévios mostrando a capacidade da cDDP em induzir *crosslinks* de DNA. Estudos *in vivo* relatando efeito protetor da LT contra a formação de *crosslinks* não foram

encontrados. Nosso trabalho mostra que animais pré-tratados com o carotenoide LT apresentaram uma diminuição significativa na formação desses *crosslinks* nos três tecidos avaliados, sangue periférico, rim e fígado. Esse efeito já foi demonstrado *in vitro*, onde a adição de antioxidantes como as vitaminas A, C e E em cultura de células em associação com a cDDP diminuiu o estresse oxidativo e a formação dos *crosslinks*, aumentando a % de DNA na cauda do cometa nos grupos associados (antioxidante + cDDP) em relação ao tratamento somente com cDDP (WOZNIAK; CZECHOWASKA; BLASIAK, 2004). Bartel *et al.* (2012) trataram culturas de células de cólon humanas SW480 com MMS e observaram aumento na intensidade da cauda, no entanto, quando associaram a cDDP ao MMS, os cometas apresentaram diminuição na intensidade da cauda mostrando também que a formação de *crosslinks* induzida pela cDDP reduz a migração das quebras de DNA produzidas pelo MMS.

Enquanto o ensaio cometa detecta lesões ainda passíveis de reparo, o teste do micronúcleo detecta mutações, alterações definitivas no DNA, resultantes de lesões não reparadas (SLESINSKI; GUZZIE, 1988). O emprego do ensaio cometa e do teste do micronúcleo pode fornecer dados complementares indicando se as lesões detectadas no ensaio cometa resultaram em mutações efetivamente visualizadas no teste do micronúcleo. Bolt, Stewart e Hengstle (2011) destacam o notável crescimento dos trabalhos empregando o teste do MN em relação aos demais testes de toxicidade ao DNA e citam os resultados obtidos neste experimento com a LT em edital publicado pela revista "Archives of Toxicology".

No teste do micronúcleo, os resultados foram semelhantes tanto nas células da medula óssea quanto no sangue periférico dos camundongos. Nos dois primeiros tempos de amostragem para o teste do micronúcleo em sangue periférico (T0: antes do início dos experimentos e T1: 36 h após o primeiro tratamento), não foram observadas diferenças significativas na frequência de micronúcleos. No último tempo de amostragem (T2: 24 h após a administração da injeção intraperitoneal de salina ou cDDP no 14º dia) a frequência de micronúcleos, tanto no sangue periférico quanto na medula óssea, foi significativamente maior para o grupo tratado somente com cDDP em relação ao grupo tratado com OM.

As administrações apenas de LT, em ambas as doses, não produziram micronúcleos, e mais ainda, a LT foi capaz de prevenir a formação de micronúcleos nos grupos que receberam LT, em ambas as doses, associada à cDDP nos dois

tecidos avaliados (Figura 17). No sangue periférico, as porcentagens de redução de MN (%R) foram de 73,7 e 70,9% e na medula óssea de 69,5 e 70,5%, para as doses de 0,2 e 0,5 mg/kg p.c de LT, respectivamente.

O teste do micronúcleo permite a determinação concomitante da citotoxicidade dos compostos na medula óssea por meio da porcentagem de PCE em relação ao total de eritrócitos (PCE + NCE) (RIBEIRO, 2003). A relação PCE/PCE+NCE é um indicador de aceleração ou inibição da eritropoiese. Um declínio nessa relação é um indicador de citotoxicidade do composto avaliado (AL-HARBI, 1993). Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos tratados comparados com o grupo controle negativo, indicando ausência de citotoxicidade da LT e da cDDP, isoladas e em associação, nas células da medula óssea nas doses utilizadas (Figura 18).

Figura 17: Frequência de células micronucleadas no sangue periférico de camundongos antes do início dos experimentos (1º dia - T0), 36 h após o primeiro tratamento (T1) e após a eutanásia no 15º dia (T2) e na medula óssea após a eutanásia (15º dia). OM: Óleo mineral, LT: luteína, cDDP: cisplatina. *Estatisticamente diferente do controle negativo e dos grupos LT. #Estatisticamente diferente do controle positivo. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Figura 18: Relação (%) entre eritrócitos policromáticos (PCE) e o total de eritrócitos (PCE + NCE) na medula óssea de camundongos após a eutanásia (15º dia). OM: óleo mineral, LT: luteína, cDDP: cisplatina. Não houve diferença estatística entre os grupos. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p > 0,05$).

A cDDP já mostrou sua capacidade de indução de danos cromossômicos em trabalhos relatados na literatura e também desenvolvidos em nosso laboratório, tanto *in vitro* (OTTO *et al.*, 1996; DUFFAUD *et al.*, 1998; ANTUNES *et al.*, 2005; MENDONÇA *et al.*, 2009) quanto *in vivo* (MAZUR; CZYZEWSKA; AUGUSTYNEK, 2000; EVANGELISTA *et al.*, 2004; MACGREGOR *et al.*, 2006; SENDÃO *et al.*, 2006).

Neste trabalho, foi observado efeito antigenotóxico da LT e, além disso, este carotenoide foi capaz de diminuir a frequência de células micronucleadas demonstrando também efeito antimutagênico. Alguns carotenoides são relatados como antimutagênicos frente a diferentes indutores de danos (BUAJEEB *et al.*, 2008; MADHYASTHA *et al.*, 2008; BARCELOS *et al.*, 2009). Até o presente momento, nenhum trabalho sobre antimutagenicidade *in vivo* relacionando o carotenoide LT à cDDP foi relatado. Os primeiros resultados mostrados neste estudo são promissores e destacam o efeito antimutagênico da LT na redução da frequência de micronúcleos induzidos pela cDDP nas células da medula óssea e do sangue periférico de camundongos. Um dos mecanismos propostos para o efeito protetor dos carotenoides está relacionado às suas atividades antioxidantes (KRINSKY, 1979).

Neste estudo, parâmetros de estresse oxidativo foram avaliados a fim de propor os mecanismos envolvidos na antigenotoxicidade e antimutagenicidade da

LT. Os parâmetros avaliados foram: concentração de GSH e a atividade da CAT no sangue periférico de camundongos, bem como a dosagem de GSH e TBARS nos tecidos renal e hepático. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Na avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo no sangue periférico dos camundongos, não houve diferença significativa na atividade da enzima CAT entre os grupos estudados. Alterações na atividade da enzima não foram observadas possivelmente devido ao curto tempo de exposição dos animais à cDDP (24 h) em contraste com 72 h nos trabalhos de Guerrero-Beltrán *et al.* (2010) e Pérez-Rojas *et al.* (2009) que mostraram diminuição da atividade da enzima após tratamento com cDDP.

Tabela 2: Avaliação do estresse oxidativo por meio das análises de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona reduzida (GSH) em rim e fígado e GSH e catalase (CAT) em sangue total de camundongos submetidos a tratamento subagudo (15 dias)

	Rim		Fígado		Sangue	
Tratamentos	TBARS*	GSH*	TBARS*	GSH*	GSH [#]	CAT (k/g Hb)
OM	51,9 ± 13,2	47,9 ± 7,1	50,9 ± 13,3	21,9 ± 1,3	0,67 ± 0,04	111,71 ± 16,92
LT 0,2	54,8 ± 21,5	44,6 ± 11,2	44,6 ± 11,2	25,6 ± 2,3	0,91 ± 0,09 ^a	98,86 ± 15,81
LT 0,5	44,6 ± 11,2	55,9 ± 7,4	55,9 ± 7,4	26,1 ± 1,5	0,85 ± 0,07 ^a	98,22 ± 19,41
OM + cDDP	126,9 ± 24,0 ^a	35,9 ± 3,6 ^a	54,8 ± 21,5	14,9 ± 1,1 ^a	0,64 ± 0,09	100,82 ± 4,63
LT 0,2 + cDDP	55,9 ± 7,3 ^b	53,4 ± 9,5 ^b	61,8 ± 8,0	23,7 ± 2,7 ^b	0,81 ± 0,09 ^{ab}	104,77 ± 20,26
LT 0,5 + cDDP	53,4 ± 9,5 ^b	59,5 ± 4,6 ^b	62,1 ± 6,1	25,9 ± 2,7 ^b	0,88 ± 0,07 ^{ab}	108,06 ± 15,77

Valores representam média ± desvio padrão de 8 animais (machos e fêmeas) em cada grupo.

OM: óleo mineral, LT: luteína, cDDP: cisplatina. *(nmol/g tecido); [#](μmol/mL de sangue);

^aEstatisticamente diferente do grupo OM, ^bEstatisticamente diferente do grupo OM + cDDP. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p < 0,05$).

No sangue periférico, a cDDP não induziu depleção de GSH, no entanto, os grupos que receberam LT, independente da dose e da associação ou não à cDDP, mostraram aumento significativo nas concentrações de GSH. Ao contrário do observado no sangue periférico, no tecido renal e hepático, em comparação com o grupo controle (OM), o tratamento com cDDP diminuiu as concentrações do antioxidante GSH.

Esse decréscimo está relacionado com o mecanismo de detoxificação da cDDP onde os grupos sulfidril e amino ou carboxil da GSH se ligam aos dois grupos cloreto da cDDP (NAKAI *et al.*, 2011). Recentemente, Nakai *et al.* (2011) elucidaram a interação da cDDP com antioxidantes endógenos como o ácido ascórbico e a GSH mostrando que a última é depletada após tratamento com cDDP por agir tanto na inativação de ER como por quelar a cDDP diretamente impedindo a formação de *crosslinks* com o DNA (Figura 19).

Figura 19: Papel do antioxidante endógeno glutatona (GSH) na inativação de espécies reativas e na quelagem da cisplatina (cDDP). Fonte: Adaptado de Nakai *et al.* (2011).

Dados sobre alterações na concentração de GSH e LT são inexistentes em roedores. Hininger *et al.* (2001), em um estudo realizado com humanos que receberam LT na dose de 15 mg/kg p.c. por três meses, não encontraram alteração nas concentrações de GSH plasmática. No entanto, nossos resultados mostraram que em camundongos a LT, mesmo em doses baixas, induz um aumento significativo nas concentrações de GSH no sangue periférico após tratamentos diários durante 13 dias e ainda foi capaz de prevenir a depleção de GSH induzida pela cDDP nos tecidos renal e hepático.

As concentrações de TBARS nos tecidos renal e hepático também foram avaliadas como parâmetros de estresse oxidativo. Nas condições empregadas neste estudo, a dose utilizada de cDDP (6 mg/kg p.c.) aumentou de forma significativa a concentração de TBARS no tecido renal, o que não foi observado para o tecido hepático. Nos animais que receberam pré-tratamento com a LT (grupos LT + cDDP), as concentrações de TBARS se mantiveram ao nível do controle negativo, indicando forte efeito protetor da LT contra a peroxidação lipídica induzida pela cDDP no tecido renal. Sindhu, Preethi e Kuttan (2010) também demonstraram efeito protetor da LT

sobre a peroxidação lipídica induzida por paracetamol em fígado de ratos, no entanto, com tratamentos diários utilizando doses entre 50 e 250 mg/kg p.c. de LT. Nossos resultados mostram que em doses cerca de 100 vezes menores e próximas da ingestão diária, a LT já é capaz de exercer efeito antioxidante frente à peroxidação lipídica induzida pela cDDP no tecido renal, o tecido mais afetado pelos efeitos adversos da cDDP.

A atividade antioxidante demonstrada para o carotenoide LT pode estar relacionada com os efeitos protetores observados no ensaio cometa e no teste do micronúcleo. Embora a maioria dos estudos tenha focado no uso da LT na prevenção de doenças oculares, nossos resultados mostram que, mesmo nas baixas concentrações presentes na dieta, a LT poderia ser utilizada com sucesso na prevenção de doenças relacionadas com o estresse oxidativo e com a indução de danos no DNA, como as doenças cardiovasculares e o câncer.

4.3. Experimento 3: Investigação dos efeitos da LT e da cDDP na expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo e defesa antioxidante em fígado de camundongos.

Na avaliação da expressão gênica foi utilizada a técnica de RT-qPCR array na qual um amplo número de genes pode ser avaliado ao mesmo tempo e nas mesmas condições experimentais (WESCOTT *et al.*, 2007). Enquanto a RT-qPCR tradicional avalia mudanças na expressão de um gene único, a RT-qPCR array permite a análise de um perfil de genes aumentando a possibilidade de se encontrar diferenças na expressão que se relacionem, por exemplo, com a atividade antioxidante de um composto.

Amostras de RNA íntegras, sem fragmentação das moléculas, e com elevado grau de pureza são necessárias para análises de expressão gênica. Neste estudo, a quantificação e o grau de pureza do RNA total foram avaliados por leitura espectrofotométrica. O grau de pureza foi avaliado para as 4 amostras dos 4 tratamentos (MO; LT 0,5 mg/kg p.c.; MO + cDDP e LT 0,5 mg/kg p.c. + cDDP) pelas razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} que indicam, respectivamente, contaminação por proteínas e fenóis e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Dados da extração de RNA total (concentração e avaliação de pureza) das amostras de fígado de camundongos coletadas após eutanásia (15º dia)

Tratamentos	[RNA] µg/mL	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
OM	832	1,75	2,30
OM + cDDP	216	1,87	2,18
LT 0,5	156	1,95	2,29
LT 0,5 + cDDP	336	1,79	2,10

OM: óleo mineral, LT 0,5: luteína 0,5 mg/kg p.c., cDDP: cisplatina 6mg/kg p.c.

De acordo com as especificações do fabricante, para a perfeita realização do método de RT-qPCR array os valores encontrados para a razão $A_{260}:A_{280}$ devem estar entre 1,8 e 2,0 e para a razão $A_{260}:A_{230}$ devem ser maiores que 1,7. As concentrações finais dos RNAs obtidas através da leitura em A_{260} devem ser maiores que 40 µg/mL. Os valores obtidos em nossos experimentos estão de acordo com as exigências do fabricante para a pureza e concentração do RNA.

A integridade do RNA total obtido com a extração foi inferida com base na integridade das bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 18S e 28S. O gel que representa o RNA intacto deve apresentar 2 bandas referentes aos RNAs 18S e 28S bem como uma pequena quantidade de RNA 5S (FLEIGE; PFAFFL, 2006) como observado para as amostras utilizadas neste experimento (Figura 20).

Figura 20: Gel de agarose de RNA total de amostras de fígados de camundongos submetidos a diferentes tratamentos. As bandas predominantes no gel correspondem ao RNA ribossômico (RNAr) 28S e o RNAr 18S. A banda de menor intensidade corresponde ao RNAr 5S e RNA transportador. 1: tratamento com óleo mineral (OM), 2: OM + cDDP, 3: luteína (LT), 4: LT + cDDP. MW: molecular weight (1 Kb). Gel de agarose desnaturante 1% corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador UV.

A RT-qPCR permitiu a análise simultânea de 84 genes envolvidos no estresse oxidativo e na defesa antioxidante. Os 84 genes avaliados foram divididos em 3 categorias de acordo com a função da proteína codificada por eles: (A) genes antioxidantes, (M) genes envolvidos no metabolismo de ER e (T) genes que codificam transportadores de oxigênio (Figura 21). Os resultados da Tabela 6 mostram as diferenças (aumento ou diminuição na expressão do gene) maiores ou igual a 2 com $p < 0,05$, comparando os grupos LT, OM + cDDP e LT + cDDP com o grupo controle negativo (OM).

Em um total de 84 genes, 28 mostraram diferença na expressão após tratamento com cDDP. A cDDP aumentou a expressão de 14,3% (9 A, 2 M e 1 T) e diminuiu a expressão de 19% dos genes (6 A, 7 M e 3 T) (Figura 21). Entre os 16 genes com expressão diminuída estão *Gpx3*, *Txnrd2*, *Prdx6*, *Prdx6-rs1* e *Srxn1*, que codificam proteínas antioxidantes e *Als2*, *Gab1* e *Nox4* que estão envolvidos no metabolismo de ER. A redução na expressão encontrada para 15 genes (exceto o gene *Prnp*) foi em média de 3,8 e o aumento encontrado na expressão de 12 genes foi de 3,2.

O tratamento com a LT aumentou a expressão de 13% dos 84 genes (7 A, 2 M e 2 T) e diminuiu a expressão de aproximadamente 9,5% (2 A, 4 M e 2 T). A média no aumento da expressão foi de 3,3 (exceto no gene que codifica a proteína mioglobina – *Mb*) e 3 genes tiveram uma significativa redução na expressão, *Gab1*, *Prnp* e *Atr*.

A associação entre LT e cDDP resultou em um aumento na expressão de 17,9% do total de genes (10 A, 3 M e 2 T), e na diminuição na expressão de 8,33% (2 A, 4 M e 1 T). O grupo dos genes que codificam as proteínas peroxirredoxinas (*Prdx1*, *Prdx2* and *Prdx3*) tiveram a expressão aumentada no tratamento associando a LT e a cDDP, mas não no tratamento somente com a cDDP. O aumento na expressão de 14 genes (exceto *Mb*) foi em média de 2,5 e o decréscimo mais evidente foi na expressão dos genes *Noxa1* e no *Prnp* (Tabela 4).

Tabela 4: Aumento ou diminuição na expressão de diferentes genes em fígado de camundongos após tratamento subagudo (15 dias) com luteína (LT) e cisplatina (cDDP), isoladas ou em combinação

Nome do Gene	Descrição do gene	Aumento/diminuição na expressão do gene		
		MO + cDDP	LT	LT + cDDP
Antioxidantes				
Aass	Amino adipate-semialdehyde synthase	2,40	2,04	2,05
Apc	Adenomatosis polyposis coli	3,09	1.47	1.83
Ctsb	Cathepsin B	2,67	2,48	1.78
Gpx1	Glutathione peroxidase 1	2,55	3,95	1.60
Gpx3	Glutathione peroxidase 3	-3,11	-1.08	1.39
Gpx4	Glutathione peroxidase 4	1.01	1.48	2,06
Gsr	Glutathione reductase	-3,01	-1.88	-2,99
Nxn	Nucleoredoxin	2,35	3,41	2,44
Txnrd2	Thioredoxin reductase 2	-3,82	-1.68	-2,24
Prdx1	Peroxiredoxin 1	1.77	1.63	2,60
Prdx2	Peroxiredoxin 2	1.87	1.84	2,15
Prdx3	Peroxiredoxin 3	1.82	1.65	2,22
Prdx4	Peroxiredoxin 4	2,14	3,67	2,30
Prdx6	Peroxiredoxin 6	-2,28	-1.38	-1.15
Prdx6-rs1	Peroxiredoxin 6, related sequence 1	-5,15	-2,46	-1.57
Serpinb1b	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1b	5,92	-1.53	1.42
Sod1	Superoxide dismutase 1, soluble	1.75	3,45	2,21
Srxn1	Sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	-2,56	-1.83	-1.67
Txnrd1	Thioredoxin reductase 1	-1.66	-4,37	-1.13
Txnrd3	Thioredoxin reductase 3	2,69	2,11	2,60
Zmynd17	Zinc finger, MYND domain containing 17	2,08	1.70	2,78
Genes envolvidos no metabolismo de ER				
Als2	Amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) homolog (human)	-3,64	-1.77	-1.88
Ccs	Copper chaperone for superoxide dismutase	5,98	5,84	4,27
Fmo2	Flavin containing monooxygenase 2	-2,21	1.28	2,67
Gab1	Growth factor receptor bound protein 2-associated protein 1	-7,26	-36,30	-3,20
Idh1	Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	-2,67	-1.98	1.09
Nox4	NADPH oxidase 4	-3,27	1.12	1.03
Noxa1	NADPH oxidase activator 1	-8.91	-8.51	-11,29
Nqo1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	3,51	1.60	3,39
Nudt15	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 15	-2,12	-2,00	-1.11
Prnp	Prion protein	-143,55	-29,01	-16,71
Scd1	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	-1.74	-2,32	-2,24
Txnip	Thioredoxin interacting protein	1.75	2,47	1.73
Transportadores de Oxigênio				
Aqr	Aquarius	-2,26	-2,38	-1.30
Atr	Ataxia telangiectasia and rad3 related	-7,97	-24,62	-4,57
Mb	Myoglobin	-5,33	61,67	48,09
Vim	Vimentin	2,76	3,49	1,86

Os valores mostrados representam média do aumento ou diminuição na expressão do gene em triplicatas. Foram considerados estatisticamente significativos valores (positivos ou negativos) maiores ou igual a 2 com $p < 0,05$ (valores em negrito).

Figura 21: Número de genes diferentemente expressos (expressão aumentada ou diminuída) em fígado de camundongos após diferentes tratamentos em relação ao grupo controle (OM). A: genes antioxidantes; M: genes envolvidos no metabolismo de espécies reativas; T: genes transportadores de oxigênio; OM: óleo mineral; cDDP: cisplatina; LT: luteína.

O tratamento associando LT e cDDP aumentou a expressão de *Sod1* e *Gpx4* que codificam proteínas que agem em conjunto com a GSH e outras enzimas antioxidantes em uma importante via de manutenção do estado redox da célula (Figura 22). O tratamento com a cDDP, sozinha ou em associação com a LT, reduziu a expressão do gene *Gsr* o que também poderia estar relacionado com modificações nessa via do estresse oxidativo, prejudicando a restauração da GSH. Essas alterações na expressão gênica também podem estar relacionadas com a diminuição nas concentrações de GSH após tratamento com cDDP e aumento nas concentrações de GSH após tratamento com LT observadas no experimento 2.

Figure 22: Representação da relação entre enzimas antioxidantes, glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG). SOD: superóxido dismutase, CAT: catalase, GR: glutathiona redutase, GPX: glutathiona peroxidase. Fonte: Zubkova; Robaire, (2004).

Nenhuma alteração foi observada na expressão do gene da catalase, responsável por inativar o H_2O_2 . Nossos resultados prévios do experimento 2 mostraram que a atividade da CAT também não é alterada após o tratamento com a LT sozinha ou associada à cDDP. Nenhum trabalho foi encontrado na literatura sobre o efeito da cDDP na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo no tecido hepático, principal órgão de biotransformação de fármacos. El-Beshbishy *et al.* (2011) mostraram que a cDDP reduz a expressão dos genes da CAT, Cu–Zn SOD e GPX em tecido renal após administração de cDDP (12 mg/kg p.c.) por 4 dias. Em administração única na dose de 6 mg/kg p.c., nosso estudo mostrou redução na expressão do gene da GPX3 extracelular e aumento da expressão do gene da GPX1 citoplasmática. A expressão do gene da GPX3 é normalmente baixa em tecido hepático uma vez que a alta expressão é limitada ao rim e em menor proporção aos epidídimos (BURK *et al.*, 2011).

Os três tratamentos comparados com o controle (OM) mostraram aumento na expressão dos genes das peroxirredoxinas, no entanto, somente o tratamento com LT associada à cDDP mostrou aumento significativo na expressão dos genes *Prdx1*, *Prdx2* and *Prdx3*. Todas as peroxirredoxinas são responsáveis pela remoção do H_2O_2 e as PRX1 e PRX2 ainda removem hidroperóxidos e peroxinitritos provenientes do metabolismo celular (RHEE *et al.*, 2005). Shiota *et al.* (2008) mostraram que o estresse oxidativo leva à indução da expressão dos genes codificadores das peroxirredoxinas para que as células respondam ao estresse aumentando a eliminação do H_2O_2 . O aumento na expressão desses genes também foi correlacionado com a modulação do estresse oxidativo *in vitro* após tratamento com o flavonoide quercetina (MIYAMOTO *et al.*, 2011). Em nosso estudo, tanto a LT quanto a cDDP induziram a expressão desses genes, no entanto, o que se pode observar foi um efeito sinérgico no tratamento associando a LT e a cDDP, indicando que a LT aumenta a resposta ao estresse oxidativo via peroxirredoxinas.

O maior aumento na expressão foi observado para o gene *Mb* (61,67 e 48,09 para LT e LT + cDDP respectivamente), enquanto a maior supressão foi notada no gene *Prnp* (143,55, 29,01 e 16,71 para OM + cDDP, LT e LT + cDDP, respectivamente).

Apesar do aumento na expressão do gene *Mb* observado nos grupos LT e LT + cDDP, o tratamento com cDDP isolada diminuiu a expressão desse gene. Esse aumento também foi observado por Baqai *et al.* (2009) que justificaram o resultado

como um preparo da célula para o seqüestro de ER. Halliwell e Gutteridge (2007) destacam o importante papel da proteína MB no armazenamento de O_2 e também o fato da MB se ligar mais fortemente ao O_2 que a hemoglobina, liberando o gás somente em casos de hipóxia e diminuindo a formação de EROs. Um importante ensaio de avaliação da capacidade dos compostos em seqüestrar ER é baseado na capacidade do 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina- 6-ácido sulfônico) ou ABTS em reagir com o radical ferril-mioglobina (formado pela reação da metamioglobina com o H_2O_2) dando origem ao $ABTS^+$. Sindhu, Preethi e Kuttan, (2010) mostraram que a LT é capaz de sequestrar o radical ferril-mioglobina apresentando, portanto, forte ação antioxidante. Nossos resultados complementam este estudo mostrando que além de atuar no sequestro desses radicais, a LT pode ainda aumentar a expressão do gene da MB aumentando a eficiência na detoxificação do H_2O_2 . O aumento na expressão desse gene também foi observado no tratamento associando LT e cDDP destacando o importante papel antioxidante da LT nessa via, uma vez que o tratamento com a cDDP isolada levou à diminuição na expressão do gene *Mb*.

As maiores supressões foram observadas para o gene *Prpn* que codifica a proteína príon (PrP^C), uma glicoproteína ancorada à membrana celular com propriedades antioxidantes (MARTINS *et al.*, 2002; NICOLAS; GAVÍN; DEL RÍO, 2009). PrP^C está relacionada com a manutenção da homeostase celular através da ligação com o cobre formando um complexo que age na proteção contra o estresse oxidativo (BROWN, 2001). Estudos realizados em cultura de neurônios também demonstraram o papel da PrP^C na modulação do estresse oxidativo atuando na regulação da atividade da SOD1 (BROWN, 2001; SORENSON, 2001). O tratamento com a cDDP diminuiu fortemente a expressão do gene *Prpn*, enquanto nos tratamentos com LT e LT + cDDP essa supressão foi até 9 vezes menor que no tratamento com cDDP isolada, mostrando que a LT pode exercer sua função antioxidante também impedindo a elevada supressão na expressão desse gene induzida pela cDDP.

A técnica de RT-qPCR array se mostrou uma importante ferramenta na análise da expressão gênica possibilitando a identificação de diferenças de expressão em genes relacionados ao estresse oxidativo. Como há poucos relatos na literatura sobre a influência da LT ou da cDDP na expressão gênica, o uso dessa técnica como *screening* inicial para identificar possíveis genes alvos modulados por esses compostos forneceu uma grande contribuição para a elucidação do

mecanismo de ação antioxidante da LT. Em resumo, os resultados da análise de expressão gênica sugerem que o tratamento com a cDDP contribui para o desequilíbrio do estado redox da célula, diminuindo a expressão de importantes genes antioxidantes e transportadores de oxigênio. De forma geral, a Figura 21 nos mostra que o número de genes com expressão diminuída pela cDDP é maior que nos tratamentos com a LT e a LT associada à cDDP nas 3 categorias de genes (A, M e T), mostrando que a LT pode atuar na modulação do estresse oxidativo induzido pela cDDP, principalmente, impedindo a diminuição na expressão desses genes de resposta ao estresse. Além disso, a LT parece melhorar a defesa antioxidante também aumentando a expressão de genes como *Prdx1*, *Prdx2*, *Prdx3* e *Mb*. Nossos resultados ainda sugerem que a LT pode apresentar efeito antioxidante não só diretamente sequestrando ER, mas também aumentando a expressão de genes antioxidantes.

4.4 Experimento 4: Avaliação *in vivo* da genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos protetores da CLb em células da medula óssea, rim, fígado e sangue periférico de camundongos, além da avaliação da capacidade antioxidante da CLb no sangue periférico por meio da dosagem de GSH, atividade da CAT e da dosagem de TBARS e GSH em rim e fígado.

Diversas reportagens foram divulgadas e continuam sendo veiculadas pela mídia a respeito dos benefícios da CL, ou dos chamados “sucos de clorofila” no organismo humano, principalmente seus efeitos protetores em doenças coronarianas, câncer, diabetes e catarata (LANFER-MARQUEZ, 2003). A maioria das comprovações científicas desses efeitos benéficos é baseada em estudos com extratos vegetais ou com a forma sintética da CL, a clorofilina ou clorofila cúprica devido à baixa estabilidade da CL natural (GAUTHIER-JAQUES *et al.*, 2001). Neste estudo, o objetivo é demonstrar se a CL natural comercial extraída do espinafre é isenta de efeitos tóxicos e se a mesma apresenta efeitos protetores sobre o estresse oxidativo e os danos no material genético induzidos pela cDDP.

Na avaliação da toxicidade, para os animais dos tratamentos com cDDP e CLb por meio da avaliação da variação de massa e das relações entre as massas de órgãos como o fígado e o rim em relação à massa corporal, nenhuma diferença estatística foi observada (Tabela 5).

Tabela 5: Variação de massa corporal durante o tratamento, expressos em gramas e porcentagem (%), e relações entre a massa do rim/massa corporal e a massa do fígado/massa corporal nos diferentes tratamentos (n=8)

Tratamentos	Massa inicial	Massa final	Ganho de massa em gramas e %	Massa rim/massa corporal	Massa fígado/massa corporal
OM	29,3±3,3	31,5±4,1	2,2 (7,5%)	1,5±0,2	5,2±0,5
OM + cDDP	29,2±1,0	32,9±1,0	3,7 (12,7%)	1,7±0,1	6,1±0,4
CLb 0,2	27,0±1,3	30,2±1,6	3,2 (11,8%)	1,4±0,1	5,3±0,4
CLb 0,5	25,6±1,1	29,5±1,7	3,9 (12,5%)	1,4±0,2	5,3±0,3
CLb 0,2 + cDDP	25,2±1,3	28,6±1,6	3,4 (13,5%)	1,5±0,1	5,7±1,5
CLb 0,5 + cDDP	25,3±2,0	27,9±3,2	2,6 (10,3%)	1,5±0,1	5,8±0,4

OM: óleo mineral, CLb: clorofila b, cDDP: cisplatina. Não houve diferença estatística entre os grupos. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p > 0,05$).

A genotoxicidade da CLb foi avaliada em células do sangue periférico, rim e fígado de camundongos por meio do ensaio cometa. As células do sangue periférico foram amostradas, como descrito nos materiais e métodos, 4 h após o primeiro tratamento (T0) e 4 h após a injeção de salina ou cDDP (T1). Em T0, todos os grupos apresentaram o mesmo padrão de migração do DNA. Em T1, os animais que receberam a CLb nas duas doses avaliadas (0,2 e 0,5 mg/kg p.c.) apresentaram o mesmo padrão de migração de DNA do grupo controle (OM) indicando ausência de genotoxicidade. O mesmo foi observado na análise das células renais e hepáticas onde também não foi evidenciado efeito genotóxico da CLb (Figura 23).

Para os animais que receberam a injeção de cDDP no 14º dia (grupo OM + cDDP) foi observada uma diminuição da migração do DNA. Wozniak, Czechowska e Blasiak (2004) observaram o mesmo efeito *in vitro*, como explicado no item 4.2. Outra explicação para a diminuição da migração do DNA pode ser baseada nos estudos de Hou *et al.* (2009) que analisaram os efeitos da cDDP nas propriedades mecânicas e estruturais do DNA lambda. Eles observaram a formação de grandes agregados de DNA que foram condensados em um grande e compacto glóbulo. Bancroft, Lepre e Lippard (1990) também mostraram a clara formação de mono e bi-aductos de DNA após tratamento com cDDP.

Na avaliação dos efeitos protetores da CLb frente à formação de *crosslinks* induzidos pela cDDP os resultados divergiram nos três tecidos avaliados. Somente a maior dose de CLb foi capaz de restabelecer a migração do DNA aos níveis do

grupo controle (OM) nas células do sangue periférico. Nas células renais e hepáticas, as duas doses de CLb apresentaram efeito protetor, prevenindo a formação dos *crosslinks* (Figura 23).

Figura 23: Porcentagem de DNA na cauda (% DNA) no ensaio cometa no sangue periférico 4 h após o primeiro tratamento (SP T0) e 4 h após a injeção de salina, cDDP ou MMS (SP T1), no fígado e no rim de camundongos (15º dia). OM: óleo mineral, CLb: clorofila b, cDDP: cisplatina, MMS: metil metano sulfonato, SP: sangue periférico. *Estatisticamente diferente do controle negativo. #Estatisticamente diferente do controle positivo (OM + cDDP). ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Os resultados das frequências de micronúcleos estão apresentados na Figura 24. As duas doses de CLb avaliadas mostram frequências de MN semelhantes ao controle OM, indicando ausência de efeito mutagênico do pigmento. O tratamento com a cDDP aumentou a frequência de MN, tanto nas células da medula óssea quanto do sangue periférico. O tratamento prévio dos animais com CLb, nas duas doses avaliadas, diminuiu de forma significativa a frequência de MN em relação ao grupo controle positivo também nos dois tecidos avaliados. As %R no sangue periférico foram de 34,0 e 31,3% e na medula óssea foram de 22,1 e 23,2% para as doses de 0,2 e 0,5 mg/kg p.c. de CLb respectivamente.

Essa diminuição na frequência de MN, apesar de pequena, é resultado do tratamento prévio com a CLb uma vez que nenhum efeito citotóxico foi observado nas células da medula óssea (Figura 25). A análise da relação PCE/PCE+NCE é importante nesses casos, pois reforça o efeito protetor da CLb e descarta a possível

interferência da citotoxicidade da cDDP na diminuição das células micronucleadas (VENKATESH *et al.*, 2007).

Figura 24: Frequência de células micronucleadas no sangue periférico de camundongos antes do início dos experimentos (1º dia - T0), 36 h após o primeiro tratamento (T1) e após a eutanásia no 15º dia (T2) e na medula óssea após a eutanásia (15º dia). OM: óleo mineral, CLb: clorofila b, cDDP: cisplatina. *Estatisticamente diferente do controle negativo e dos grupos LT. #Estatisticamente diferente do controle positivo. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Figura 25: Relação (%) entre eritrócitos policromáticos (PCE) e o total de eritrócitos (PCE + NCE) na medula óssea de camundongos após a eutanásia (15º dia). OM: óleo mineral, CLb: clorofila b, cDDP: cisplatina. Não houve diferença estatística entre os grupos. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p > 0,05$).

Poucos estudos estão disponíveis sobre a genotoxicidade e mutagenicidade da CL e de seus efeitos protetores no DNA. Em nosso trabalho, a CLb mostrou ausência de efeito genotóxico e mutagênico e um efeito protetor nos dois parâmetros avaliados. Sarkar, Sharma e Talukder (1996) mostraram que a CL extraída de folhas de espinafre e a CL obtida da Sigma Chemical Company foram clastogênicas após tratamento agudo (24 h) de camundongos com a dose de 1,5 mg/kg p.c. no teste de aberrações cromossômicas, uma dose até 7 vezes maior que as utilizadas em nosso estudo.

Sobre os efeitos protetores, os dados da literatura são concentrados em estudos com extratos vegetais e com a clorofilina, um sal sódico da CL da qual foi retirada a cadeia lateral e o átomo de magnésio foi substituído pelo cobre. Efeitos protetores foram observados para a clorofilina em diferentes testes de mutagenicidade com diferentes indutores de danos ao DNA (WARNER; NATH; ONG, 1991; CHERNOMORSKY *et al.*, 1997; DASHWOOD *et al.*, 1998; CHO *et al.*, 2000). CL é capaz de inibir a genotoxicidade agindo diretamente no mutágeno e prevenindo a sua absorção, particularmente daqueles compostos com estrutura aromática e também da radiação ionizante (MINGUEZ-MOSQUERA; HORNERO-MENDEZ; PEREZ-GALVEZ, 2002).

As ER são capazes de danificar a molécula de DNA podendo gerar alterações transitórias, que podem ser detectadas pelo ensaio cometa, ou definitivas como as mutações, detectadas pelo teste do micronúcleo. A cDDP é um conhecido quimioterápico indutor de ER nas células epiteliais renais, principalmente pela diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e pela depleção nas concentrações de GSH (SANTOS *et al.*, 2008; CHIRINO; PEDRAZA-CHAVERRI, 2009). Tióis, como a GSH, se ligam à platina da molécula, prevenindo a ligação da molécula de cDDP à outras moléculas celulares (BERNERS-PRICE; KUCHEL, 1990). Muitos trabalhos já reportaram a nefrotoxicidade da cDDP (NISHIKAWA *et al.*, 2001, TAGUCHI *et al.*, 2005, DO AMARAL, 2008) e também ressaltaram as ER como principais responsáveis pelo dano no tecido renal.

Um dos objetivos deste estudo foi avaliar os efeitos dos tratamentos com CLb e cDDP, isoladas ou associadas, no estado redox da célula avaliando parâmetros de estresse oxidativo. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos na avaliação das concentrações de GSH e atividade da CAT em sangue periférico e das concentrações de GSH e TBARS nos tecidos renal e hepático.

No sangue periférico dos camundongos não houve diferença na atividade da CAT entre os tratamentos. A cDDP não depletou as concentrações de GSH quando administrada isolada (OM + cDDP). Nos tratamentos com a CLb, isolada ou associada à cDDP, somente os animais que receberam a maior dose da CLb mostraram aumento nas concentrações de GSH em relação ao grupo controle (OM).

Nas células renais, a cDDP induziu um aumento significativo nas concentrações de TBARS indicando o forte papel que esse quimioterápico exerce na indução de peroxidação lipídica. Quando a cDDP foi associada à CLb, uma diminuição na peroxidação lipídica foi observada para as duas doses de CLb avaliadas. Esse mesmo resultado não foi observado para as células hepáticas no qual o tratamento com a cDDP não induziu peroxidação lipídica, o que reforça a toxicidade específica da cDPP no tecido renal.

Na avaliação da concentração de GSH nos tecidos renais e hepáticos, ao contrário do observado para o sangue periférico, a cDDP induziu a depleção de GSH em ambos tecidos. Quando associada à CLb, nenhum efeito protetor foi encontrado nos dois tecidos, uma vez que a CLb, nas duas doses avaliadas, não foi capaz de impedir a depleção de GSH induzida pela cDDP.

Tabela 6: Avaliação do estresse oxidativo por meio das análises de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathiona reduzida (GSH) em rim e fígado e GSH e catalase (CAT) em sangue total de camundongos submetidos a tratamento subagudo (15 dias)

	Rim		Fígado		Sangue	
Tratamentos	TBARS*	GSH*	TBARS*	GSH*	GSH [#]	CAT (k/g Hb)
OM	49,0 ± 10,2	10,0 ± 1,5	40,9 ± 3,3	19,1 ± 3,8	0,96 ± 0,06	516,54 ± 93,31
CLb 0,2	61,1 ± 15,0	9,3 ± 1,5 ^b	41,3 ± 7,2	21,7 ± 3,3 ^b	0,94 ± 0,10	560,06 ± 99,27
CLb 0,5	62,1 ± 30,4	8,5 ± 2,3 ^b	45,9 ± 12,8	19,1 ± 4,4 ^b	1,08 ± 0,07 ^b	541,17 ± 92,22
OM + cDDP	126,9 ± 24,0 ^a	6,5 ± 0,8 ^a	42,8 ± 3,7	12,1 ± 1,0 ^a	0,87 ± 0,12	550,60 ± 55,10
CLb 0,2 + cDDP	55,9 ± 27,7 ^b	6,2 ± 1,8	49,5 ± 6,7	15,0 ± 3,2 ^a	0,94 ± 0,11	521,61 ± 45,29
CLb 0,5 + cDDP	51,5 ± 10,1 ^b	5,1 ± 0,9 ^a	50,9 ± 10,6	12,8 ± 3,0 ^a	1,08 ± 0,12 ^b	539,17 ± 48,00

Valores representam média ± desvio padrão de 8 animais (machos e fêmeas) em cada grupo.

OM: óleo mineral, CLb: clorofila b, cDDP: cisplatina. *(nmol/g tecido); [#](μmol/mL de sangue);

^aEstatisticamente diferente do grupo OM, ^bEstatisticamente diferente do grupo OM + cDDP.

ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p < 0,05$).

O aumento nas concentrações de GSH observado para o sangue periférico pode ser associado aos efeitos protetores observados para a CLb por meio da diminuição de ER e consequente diminuição na oxidação do DNA e proteínas e na formação dos *crosslinks*. Alguns estudos realizados *in vitro* têm sugerido que aminoácidos oxidados estão diretamente envolvidos na formação de *crosslinks* DNA-proteína (GEBICK; GEBICK, 1999; LUXFORD; DEAN; DAVIES, 2002; LI *et al.*, 2008). Essa relação parece ser verdadeira, uma vez que, somente a maior dose da CLb foi capaz de aumentar as concentrações de GSH e de diminuir a formação de *crosslinks*.

Poucos estudos estão disponíveis sobre a capacidade antioxidante da CL, no entanto, sua estrutura química, principalmente o grupo porfirínico, sugere a capacidade antioxidante dessa molécula. Lui e Chen (1998) sugeriram que a CL pode agir como doadora de hidrogênio e Buratti *et al.* (2001) mostraram que a CLb tem uma capacidade antioxidante maior do que carotenoides como a astaxantina e a cataxantina. Outras investigações mostraram que a CL tem a capacidade de sequestrar ER (FERRUZZI; FAILLA; SCHWARTZ, 2002).

Em nosso trabalho, nós usamos o marcador enzimático (CAT) e não-enzimático (GSH) além do biomarcador de peroxidação lipídica (TBARS) para avaliar a capacidade antioxidante da CLb e oxidante da cDDP. A CLb mostrou efeitos controversos quanto a atividade antioxidante porque: a) no sangue total, CLb 0,5 mg/kg p.c. foi capaz de aumentar a concentração de GSH mesmo sem efeito oxidativo observado para cDDP; b) nos tecidos renais e hepáticos, a CLb nas duas doses avaliadas não foi capaz de restabelecer as concentrações de GSH, depletadas pela cDDP; c) no tecido renal, a CLb em ambas as doses avaliadas restabeleceu os níveis de TBARS aumentados pela cDDP. Esse último dado ressalta a nefrotoxicidade da cDDP e o importante papel que a CLb exerceu diminuindo a peroxidação lipídica no tecido renal. Outra observação importante em nosso estudo foi a diferença nos resultados para as duas concentrações avaliadas. Tanto para o ensaio cometa quanto para a dosagem de GSH no sangue periférico, somente a maior dose utilizada apresentou efeitos protetores.

4.5 Experimento 5: Avaliação *in vivo* da genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos protetores da combinação dos pigmentos naturais LT e CLb em células da medula

óssea, sangue periférico, rim e fígado de camundongos e avaliação da atividade antioxidante da combinação de pigmentos por meio da dosagem de GSH e CAT em sangue total.

A LT e a CLb, quando avaliadas isoladamente, além de não mostrarem citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, também apresentaram efeitos protetores tanto para os danos induzidos no DNA quanto para o estresse oxidativo induzido pela cDDP (SERPELONI *et al.*, 2010; SERPELONI *et al.*, 2011). Assim, poderia a combinação dos pigmentos associada à cDDP produzir um efeito sinérgico com uma melhora ainda mais significativa dos parâmetros de danos ao DNA e estresse oxidativo? Ou a administração dos dois pigmentos em conjunto interferiria nos efeitos protetores exibidos pelos mesmos isoladamente?

Para responder essas perguntas, a LT e a CLb foram administradas em conjunto. As doses avaliadas dos pigmentos foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos com os pigmentos isolados. Como somente a maior dose da CLb apresentou efeito protetor no ensaio cometa e atividade antioxidante, a maior dose (0,5 mg/kg p.c.) foi escolhida para avaliação da combinação dos pigmentos.

Na avaliação da toxicidade dos tratamentos, assim como observado para os pigmentos isolados, a combinação dos pigmentos não variou a massa corporal dos animais e nem as relações entre a massa do órgão (rim ou fígado) e a massa corporal (Tabela 7).

Tabela 7: Variação de massa corporal durante o tratamento, expressos em gramas e porcentagem (%), e relações entre a massa do rim/massa corporal e a massa do fígado/massa corporal nos diferentes tratamentos, expressos em porcentagem (n=8)

Tratamentos	Massa inicial	Massa final	Ganho de massa em gramas e %	Massa rim/massa corporal	Massa fígado/massa corporal
OM	29,3±3,3	31,5±4,1	2,2 (7,5%)	1,5±0,2	5,2±0,5
OM + cDDP	29,2±1,0	30,0±1,0	0,8 (2,8%)	1,7±0,1	6,1±0,4
LT + CLb	29,4±3,6	31,7±3,6	2,3 (7,8%)	1,5±0,1	5,9±0,5
LT + CLb + cDDP	28,4±3,6	30,4±3,2	2,0 (7,0%)	1,6±0,6	5,6±0,2

OM: óleo mineral, LT: luteína, CLb: clorofila b, cDDP: cisplatina. Não houve diferença estatística entre os grupos. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p > 0,05$).

A genotoxicidade foi avaliada em células do sangue periférico, rim e fígado de camundongos e os resultados obtidos foram semelhantes ao controle negativo, indicando ausência de efeito genotóxico da combinação de pigmentos. Na avaliação dos efeitos protetores frente à cDDP, os resultados também foram semelhantes nos três tecidos avaliados com a combinação de pigmentos apresentando efeito antigenotóxico por meio da redução na formação dos *crosslinks* (Figura 26). Os pigmentos isolados nas concentrações utilizadas nessa combinação, também apresentaram efeito antigenotóxico.

Figura 26: Porcentagem de DNA na cauda (% DNA) no ensaio cometa no sangue periférico 4 h após o primeiro tratamento (SP T0) e 4 h após a injeção de salina, cDDP ou MMS (SP T1), no fígado e no rim de camundongos (15º dia). OM: Óleo mineral, LT: luteína, CLb: clorofila b, cDDP: cisplatina, MMS: metil metano sulfonato, SP: sangue periférico. *Estatisticamente diferente do controle negativo. #Estatisticamente diferente do controle positivo (OM + cDDP). ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Os resultados das frequências de MN obtidas após análise da medula óssea e no sangue periférico dos camundongos estão apresentados na Figura 27. A LT e a CLb em combinação, assim como demonstrado para os pigmentos isolados (Experimentos 2 e 4) não induziram a formação de MN o que demonstra ausência de efeito mutagênico nos dois tecidos avaliados. O tratamento prévio dos animais com a combinação dos pigmentos diminuiu de forma significativa a frequência de MN em

relação ao grupo OM + cDDP, indicando efeito antimutagênico da combinação frente aos danos no DNA induzidos pela cDDP também nos dois tecidos.

Quando avaliados isoladamente, os pigmentos apresentaram efeito antimutagênico, no entanto, a redução com a combinação foi maior que com a CLb e a LT isoladas. Na dose de 0,5 mg/kg p.c. a LT mostrou %R de 70,9 e 70,5% e a CLb de 31,3 e 23,2% nas células do sangue periférico e da medula óssea, respectivamente. Na combinação dos pigmentos, as %R encontradas foram de 77,4% para as células do sangue periférico e 72,0% para as células da medula óssea. Esses resultados mostram que o efeito protetor superior mostrado pela LT isolada permanece na combinação dos pigmentos e ainda apresenta um leve aumento.

Figura 27: Frequência de células micronucleadas no sangue periférico de camundongos antes do início dos experimentos (1º dia - T0), 36 h após o primeiro tratamento (T1) e após a eutanásia no 15º dia (T2) e na medula óssea após a eutanásia (15º dia). OM: Óleo mineral, LT: luteína, CLb: clorofila b, cDDP: cisplatina. *Estatisticamente diferente do controle negativo e dos grupos LT. #Estatisticamente diferente do controle positivo. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Assim como demonstrado para os pigmentos isolados, também não foi observado nenhum efeito citotóxico nas células da medula óssea (Figura 28).

Figura 28: Relação (%) entre eritrócitos policromáticos (PCE) e o total de eritrócitos (PCE + NCE) na medula óssea de camundongos após a eutanásia (15º dia). OM: óleo mineral, LT: luteína, CLb: clorofila b, cDDP: cisplatina. Não houve diferença estatística entre os grupos. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p > 0,05$).

A concentração de GSH e a atividade da CAT no sangue periférico de camundongos foram avaliadas como parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo, e os resultados obtidos são mostrados na Figura 29. A cDDP, assim como demonstrado para os pigmentos isolados, não diminuiu a concentração do antioxidante GSH em relação ao grupo controle negativo (OM) (Figura 29a), nas condições empregadas neste estudo. O tratamento somente com a combinação dos pigmentos e com os mesmos associados à cDDP mostrou aumento nas concentrações de GSH que foram superiores tanto ao controle OM quanto ao controle OM + cDDP.

Tanto a LT como a CLb isoladas, nas doses utilizadas na combinação dos pigmentos (0,5 mg/kg p.c.), induziram o aumento nas concentrações do antioxidante endógeno GSH. Esse aumento foi visto novamente com os pigmentos combinados (LT 0,5 mg/kg p.c. + CLb 0,5 mg/kg p.c.) tanto para o tratamento somente com os pigmentos quanto para o tratamento seguido de administração da cDDP, mostrando que a combinação dos pigmentos não afeta a atividade antioxidante que eles apresentam isolados.

Na avaliação da atividade da enzima CAT (Figura 29b), não foi observada a indução nem inibição da atividade da enzima em qualquer dos tratamentos realizados, como demonstrado e discutido para os pigmentos isolados nos experimentos 2 e 4.

Figura 29: a) Concentração de glutathiona (GSH) e b) atividade da catalase (CAT) em sangue periférico de camundongos após eutanásia (15º dia). OM: óleo mineral, LT: luteína, CLb: clorofila b, cDDP: cisplatina. *Estatisticamente diferente do grupo OM. #Estatisticamente diferente do grupo OM + cDDP. ANOVA uma via e teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Considerando os resultados obtidos na avaliação dos danos ao DNA e nos parâmetros de estresse oxidativo, podemos concluir que a combinação dos pigmentos não induz qualquer tipo de toxicidade nas condições empregadas neste estudo. Além disso, a atividade antioxidante observada para os pigmentos isolados é mantida nos tratamentos com a combinação e um efeito protetor ainda mais significativo foi observado no teste do MN.

Alguns estudos combinando diferentes compostos já foram realizados em nosso grupo de estudo. Antunes *et al.*, (2000) avaliaram os efeitos protetores da curcumina e da vitamina C, isoladas ou associadas, sobre os efeitos mutagênicos da cDDP. Isolados, os compostos apresentaram efeito protetor significativo, porém, em combinação o mesmo efeito não foi observado, possivelmente, por uma interação entre os compostos que inibe suas atividades isoladas. A associação da vitamina E

e vitamina C foi efetiva em diminuir as aberrações cromossômicas induzidas pelo quimioterápico doxorrubicina (ANTUNES; TAKAHASHI, 1998).

Como a LT é encontrada principalmente nos vegetais verdes folhosos, a presença abundante de CL poderia ser um interferente na absorção da LT e também na manifestação dos seus efeitos biológicos. No entanto, nossos resultados são importantes não só para mostrar que a combinação dos pigmentos pode ser utilizada de forma segura, mas também podemos inferir que, o consumo de alimentos ricos em LT, como os vegetais verdes folhosos, que também apresentam alta quantidade de CLb pode ser de grande relevância para a promoção da saúde.

CONCLUSÕES

5. Conclusões

5.1 Experimentos com a LT

a) Os testes *in vitro* em células HepG2 revelaram ausência de efeito genotóxico da LT e uma diminuição na formação dos *crosslinks* induzidos pela cDDP após o tratamento com o carotenoide. O efeito protetor pode estar relacionado à capacidade antioxidante da LT observada nos três parâmetros avaliados (GSH, ER e cit-c).

b) Os resultados obtidos com o carotenoide LT *in vivo* mostraram ausência de efeito genotóxico e mutagênico nas células da medula óssea e do sangue periférico e também dos tecidos renais e hepáticos de camundongos nas duas doses avaliadas. O aumento nas concentrações do antioxidante GSH tanto no sangue periférico quanto nos tecidos após tratamento com LT pode explicar os efeitos protetores observados sobre os danos no DNA induzidos pela cDDP. Também foi observado um efeito protetor da LT, em doses normalmente consumidas na dieta, frente à peroxidação lipídica induzida pela cDDP no tecido renal.

c) A análise da expressão gênica utilizando a técnica de RT-qPCR array mostrou que o tratamento com a cDDP contribui para o desequilíbrio do estado redox da célula, diminuindo a expressão de importantes genes antioxidantes e transportadores de oxigênio. A LT parece melhorar a defesa antioxidante principalmente aumentando a expressão de genes alvo como *Prdx1*, *Prdx2*, *Prdx3* e *Mb*. Nossos resultados sugerem que os carotenoides como a LT podem apresentar efeito antioxidante não só diretamente sequestrando ER, mas também aumentando a expressão de genes antioxidantes.

5.2 Experimentos com a CLb

Nenhum efeito genotóxico ou mutagênico foi observado para a CLb nos tecidos e nas doses avaliadas. Efeito antigenotóxico foi observado para os três tipos celulares analisados, sendo a proteção mais expressiva nas células renais e hepáticas. A avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo mostrou um forte efeito protetor da CLb diante da peroxidação lipídica induzida pela cDDP nas células renais. A CLb também apresentou capacidade antioxidante, no entanto, os resultados parecem ser tecido-específicos uma vez que a maior dose avaliada

aumentou os níveis de GSH no sangue, as duas doses restabeleceram os níveis de TBARS no rim e não foram capazes de restabelecer os níveis de GSH nos tecidos renais e hepáticos.

5.3 Experimentos com a combinação dos pigmentos LT e CLb

A combinação dos pigmentos LT e CLb não apresentou efeito citotóxico, genotóxico ou mutagênico nas células do sangue periférico, medula óssea, rim e fígado de camundongos. A associação dos pigmentos não alterou o efeito protetor observado com os pigmentos isolados e o efeito antimutagênico observado no teste do micronúcleo foi ainda maior para os pigmentos associados. O tratamento prévio dos animais com os pigmentos associados ou não à injeção de cDDP ainda aumentou as concentrações GSH no sangue periférico.

Nossos resultados ressaltam a importância da avaliação de vários parâmetros, citogenéticos, bioquímicos e moleculares para a identificação de compostos antioxidantes da dieta que possam exercer efeitos protetores sobre os danos induzidos no DNA e nos componentes celulares. Nossos resultados ressaltam ainda, principalmente, que a associação desses parâmetros com a avaliação da modulação da expressão gênica é fundamental para a compreensão dos mecanismos de ação destes compostos em nível molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas*

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, New York, v. 105, p. 121-126. 1984.

AFMAN, L.; MULLER, M. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 106, p. 569-576, 2006.

AL-HARBI, M.M. Effect of captropil on the cytological and biochemical changes induced by adriamycin. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford; New York, v. 31, p. 209-212, 1993.

AN, J.; CHEN, Y.; HUANG, Z. Critical upstream signals of cytochrome c release induced by a novel Bcl-2 inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279 (18), p. 19133-19140, 2004.

ANDERSSON, M.A., *et al.* Evaluation of the potential genotoxicity of chromium picolinate in mammalian cells *in vivo* and *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford; New York, v. 45 (7), p. 1097-1106, 2007.

ANGELI, J.P., *et al.* Evaluation of the genotoxic and anti-genotoxic activities of silybin in human hepatoma cells (HepG2). **Mutagenesis**, Oxford; Washington, v. 25 (3), p. 223-229, 2010.

ANTUNES, L.M.G.; TAKAHASHI, C. S. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 419 (1-3), p. 137-143, 1998.

ANTUNES, L.M., *et al.* Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 465 (1-2), p. 131-137, 2000.

ANTUNES, L.M.; DARIN, J.D.; BIANCHI, M.DE.L. Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. **Pharmacological Research**, London; San Diego, v. 43 (2), p. 145-150, 2001.

* As referências foram apresentadas de acordo com a norma "International Organization for Standardization", conforme publicado nas "diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP".

ANTUNES, L.M., *et al.* Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 585 (1-2), p. 113-119, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução - CNNPA nº 44, de 1977**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/44_77.htm. Acesso em: 02 de novembro de 2011.

AZQUETA, A.; SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A.R. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 674 (1-2), p. 101-108, 2009.

AZEVEDO, L., *et al.* Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melanogena*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford; New York, v. 45 (5), p. 852-858, 2007.

BAQAI, F.P., *et al.* Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 106 (6), p. 1935-1942, 2009.

BALUCHAMY, S., *et al.* Differential oxidative stress gene expression profile in mouse brain after proton exposure. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, Columbia, v. 46, p. 718-725, 2010.

BANCROFT, D.P.; LEPRE, C.A.; LIPPARD, S.J. Pt NMR kinetic and mechanistic studies of cis- and trans-diamine-dichloroplatinum (ii) binding to DNA. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 112, p. 6860-6871, 1990.

BARCELOS, G.R., *et al.* Effect of annatto on micronuclei induction by direct and indirect mutagens in HepG2 cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 50 (9), p. 808-814, 2009.

BARTEL, C., *et al.* Cellular accumulation and DNA interaction studies of cytotoxic trans-platinum anticancer compounds. **Journal of biological inorganic chemistry**, Berlin, 2012. In press.

BAUERNFEIND, J. C. Natural food colors. In: BAUERNFEIND, J. C., Ed., **Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors**. New York: Academic Press, 1981.

BERNERS-PRICE, S.J.; KUCHEL, P.W. Reaction of cis- and trans-[PtCl₂(NH₃)₂] with reduced glutathione inside human red blood cells, studied by ¹H and ¹⁵N-[¹H] DEPT NMR. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 38 (4), p. 327-345, 1990.

BHOSALE, P., *et al.* Identification and characterization of a Pi isoform of glutathione S-transferase (GSTP1) as a zeaxanthin-binding protein in the macula of the human eye. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, p. 49447-49454, 2004.

BOHN, T.; WALCZYK, T. Determination of chlorophyll in plant samples by liquid chromatography using zinc-phthalocyanine as an internal standard. **Journal of Chromatography. A.**, Amsterdam; New York, v. 1024 (1-2), 123-128, 2004.

BOLT, H.M.; STEWART, J.D.; HENGSTLER, J.G. A comprehensive review about micronuclei: mechanisms of formation and practical aspects in genotoxicity testing. **Archives of Toxicology**, Berlin, New York, v. 85 (8), p. 861-862, 2011.

BONE, R.A.; LANDRUM, J.T. Distribution of macular pigment components, zeaxanthin and lutein, in human retina. **Methods in Enzymology**, New York, v. 213, p. 360-366, 1992.

BOULIKAS, T. Molecular mechanisms of cisplatin and its liposomally encapsulated form, Lipoplatin™. Lipoplatin™ as a chemotherapy and antiangiogenesis drug. **Cancer Therapy**, Alimos; Athens, v. 5, p. 351-376, 2007.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREITHAUPT, D.E.; WIRT, U.; BAMEDI, A. Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 66-70, 2002.

BRONZETTI, G.; GALLI, A.; DELLA CROCE, C. Antimutagenic effects of chlorophyllin. **Basic Life Sciences**, New York, v. 52, 463-468, 1990.

BROWN, D.R. Copper and prion disease. **Brain Research Bulletin**, New York, v. 55, p. 165-173, 2001.

BROZOVIC, G., *et al.* Evaluation of DNA damage *in vivo* induced by combined application of cisplatin and sevoflurane. **European Journal of Anaesthesiology**, Oxford; Boston, v. 25 (8), p. 642-647, 2008.

BUAJEED, W., *et al.* Reduction of micronuclei in oral lichen planus supplemented with beta-carotene. **Journal of Oral Science**, Tokyo, v. 50 (4), p. 461-467, 2008.

BURATTI, S., *et al.* Rapid electrochemical method for the evaluation of the antioxidant power of some lipophilic food extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49 (11), p. 5136-5141, 2001.

BURK, R.F., *et al.* Glutathione peroxidase-3 produced by the kidney binds to a population of basement membranes in the gastrointestinal tract and in other tissues. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 301, p. 32-38, 2011.

CAMARA, B.; BOUVIER, F. Oxidative remodeling of plastid carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 430 (1), p. 16-21, 2004.

CANOVAS, *et al.* Pigmentos maculares. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 72 (6), p. 839-844, 2009.

CARPENTIER, S.; KNAUS, M.; SUH, M. Associations between lutein, zeaxanthin, and age-related macular degeneration: an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 49 (4), p. 313-326, 2009.

CHERNOMORSKY, S., *et al.* Antimutagenicity, cytotoxicity and composition of chlorophyllin copper complex. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 120 (2), p. 141-147, 1997.

CHIRINO, Y.I.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Jena; New York, v. 61, p. 223-242, 2009.

CHO, Y.S., *et al.* Chemopreventive activity of porphyrin derivatives against 6-sulfooxymethylbenzo[a]pyrene mutagenicity. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 1 (4), p. 311-317, 2000.

CIMINO, M.C. Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 47, p. 362-390, 2006.

COLLINS, A.R.; DUTHIE, S.J.; DOBSON, V.L. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. **Carcinogenesis**, New York, v. 14, p. 1733-1735, 1993.

COLLINS, C., *et al.* Differential oxidation of deoxyribose in DNA by gamma and alpha-particle radiation. **Radiation Research**, Charlottesville, v. 163 (6), p. 654-662, 2005.

CONNER, E.M.; GRISHAM, M.B. Inflammation, free radicals, and antioxidants. **Nutrition**, Burbank, v. 12, p. 274-277, 1996.

CORONA-RIVERA, A., *et al.* Protective *in vivo* effect of curcumin on copper genotoxicity evaluated by comet and micronucleus assays. **Journal of Applied Genetics**, Poznań, v. 48 (4), p. 389-396, 2007.

CRASTA, K., *et al.* DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. **Nature**, London, 2012. In press.

CSGMT (Colaborative Study Group for the Micronucleus Tests). **Mutagenesis**, Oxford; Washington, v. 10, p. 153-159, 1995.

DASHWOOD, R., *et al.* Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B1: a review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 399, p. 245-253, 1998.

DAUER, A., *et al.* Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (Hep G2) using single cell gel electrophoresis. **Phytochemistry**, Oxford, v. 63 (2), p. 199-207, 2003.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 402, p. 151-158, 1998.

DE FLORA, S., *et al.* Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 480-481, p. 9-22, 2001.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 591 (1-2), p. 8-15, 2005.

DE FLORA, S.; RAMEL, C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 202, p. 285-306, 1988.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 40 (3), p. 173-289, 2000.

DIXON, R.A. Phytoestrogens. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 225-261, 2004.

DO AMARAL, C.L. *et al.* Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 82 (6), p. 363-370, 2008.

DOWNHAM, A; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science & Technology**, Mysore, v. 35, p. 5-22, 2000.

DUFFAUD, F., *et al.* Doxorubicin and cisplatin genotoxicity: search for a real indication using the micronucleus test. **Annales de Biologie Clinique**, Paris, v. 56 (2), p. 183-187, 1998.

DWYER, J.H., *et al.* Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles atherosclerosis study. **Circulation**, Dallas, v. 103 (24), p. 2922-2927, 2001.

EDENHARDER, R.; LEOPOLD, C.; KRIES, M. Modifying actions of solvent extracts from fruit and vegetable residues on 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA 98. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 341 (4), p. 303-318, 1995.

EL-BESHBISHY, H.A., *et al.* Abrogation of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by alpha lipoic acid through ameliorating oxidative stress and enhancing gene expression of antioxidant enzymes. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 668, p. 278-284, 2011.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 82, p. 70-77, 1959.

ENDO, Y.; USUKI, R.; KANEDA, T. Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 62 (9), p. 1387-1390, 1985.

ENDO, Y.; USUKI, R.; KANEDA, T. Prooxidant activities of chlorophylls and their decomposition products on the photooxidation of methyl linoleate. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 61 (4), p. 781-784, 1984.

ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 594, p. 57-72, 2010.

EVANGELISTA, C.M., *et al.* Effects of the olive, extra virgin olive and canola oils on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford; New York, v. 42 (8), p. 1291-1297, 2004.

FAIRBAIRN, D.W., *et al.* The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 339 (1), p. 37-59, 1995.

FDA, Food and Drug Administration. **GRAS Notice Inventory. GRN 000291. Crystalline lutein.** Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rottpgrasListing&id=2>. Acesso em: 15 de novembro de 2011.

FDA, Food and Drug Administration. **Federal Register Final Rule 67 FR 35429 - May 20, 2002: Listing of Color Additives Exempt From Certification; Sodium Copper Chlorophyllin.** Disponível em: <http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ColorAdditiveListingRegulations/ListingofColorAdditivesExemptfromCertification/ucm108066.htm>. Acesso em: 18 de dezembro de 2010.

FENECH, M., *et al.* The Human Micronucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 428, p. 271-283, 1999.

FENECH, M. Nutrition and genome health. **Forum of Nutrition**, Basel, v. 60, p. 49-65, 2007.

FERGUSON, L.R.; PHILPOTT, M.; DRYLAND, P. Nutrigenomics in the whole-genome scanning era: Crohn's disease as example. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, Boston, v. 64 (23), p. 3105-3118, 2007.

FERRARI, C.K.B. Free radicals, lipid peroxidation and antioxidants in apoptosis: implications in cancer, cardiovascular and neurological diseases. **Biologia**, Bratislava, v. 55, p. 581-90, 2000.

FERRUZZI, M.G.; FAILLA, M.L.; SCHWARTZ, S.J. Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an *in vitro* digestion and Caco-2 human cell model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 2082-2089, 2001.

FERRUZZI, M.G.; FAILLA, M.L.; SCHWARTZ, S.J. Sodium copper chlorophyllin: *in vitro* digestive stability and accumulation by Caco-2 human intestinal cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50 (7), 2173-2179, 2002.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M.W. RNA integrity and the effect on the realtime qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, Boston, v. 27, p. 126-139, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Evaluation of certain food additives**. Geneva, 1974. p. 1-37. (Technical Report Series, 557).

FOWLER, P., *et al.* Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 742, p. 11-25, 2012.

FRITZ, R., *et al.* Compartment-dependent management of H₂O₂ by peroxisomes. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 42 (7), p. 1119-1129, 2007.

GAJECKA, M. *et al.* The protective effect of vitamins C and E against B(a)P-induced genotoxicity in human lymphocytes. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, New York, v. 18, p. 159-167, 1999.

GARCÍA-CAÑAS, V., *et al.* Advances in Nutrigenomics research: novel and future analytical approaches to investigate the biological activity of natural compounds and food functions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford; New York, v. 51 (2), p. 290-304, 2010.

GAUDIN, J., *et al.* *In vivo* DNA damage induced by the cyanotoxin microcystin-LR: Comparison of intra-peritoneal and oral administrations by use of the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 652 (1), p. 65-71, 2008.

GAUTHIER-JAQUES, A., *et al.* Improved method to track chlorophyll degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 1117-1122, 2001.

GEBICKI, S.; GEBICKI, J.M. Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides. **The Biochemical Journal**, London, v. 338, p. 629-636, 1999.

GERSTER, H. Potential role of lycopene for human health. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 16, p. 109-126, 1997.

GIUGLIANO, D. Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, Heidelberg, v. 10 (1), p. 38-44, 2000.

GOHIL, K.; CHAKRABORTY, A.A. Applications of microarray and bioinformatics tools to dissect molecular responses of the central nervous system to antioxidant micronutrients. **Nutrition**, Burbank; Calif, v. 20 (1), p. 50-55, 2004.

GOMES, K., *et al.* Avaliação da presença de corantes azóicos em medicamentos para uso pediátrico comercializados no Brasil. **Comunicação em Ciências da Saúde**, Brasília, v. 18 (1), p. 51-56, 2007.

GREGUS, Z.; KLAASSEN, C.D. Mechanism of toxicity. In: Casarett & Doull's. Toxicology: **The Basic Science of Poisons**. (Ed). New York: McGraw-Hill, 2001.

GROSS, J. **Pigments in vegetables, chlorophylls and carotenoids**. New York: Van Nostrand-Reinhold, 1991.

GROTTO, D., *et al.* Low levels of methylmercury induce DNA damage in rats: protective effects of selenium. **Archives of Toxicology**, Berlin; New York, v. 83 (3), p. 249-254, 2009.

GUERRERO-BELTRÁN, C.E., *et al.* Sulforaphane protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 192 (3), p. 278-285, 2010.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. Oxford: Clarendon Press, 2007.

HAMMOND, B.R.JR. Possible role for dietary lutein and zeaxanthin in visual development. **Nutrition Reviews**, Baltimore, v. 66 (12), p. 695-702, 2008.

HANKINSON, S.E., *et al.* Nutrient intake and cataract extraction in women: a prospective study. **British Medical Journal**, London, v. 305 (6849), p. 335-339, 1992.

HARI, R.K.; PATEL, T.R.; MARTIN, A.M. An overview of pigment production in biological systems: functions, biosynthesis, and applications in food industry. **Food Reviews International**, Madison, v. 10 (1), p. 49-70, 1994.

HARTMAN, P.E.; SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 15 (3), p. 145-182, 1990.

HARTMANN, A., *et al.* Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. **Mutagenesis**, Oxford; Washington, v. 18 (1), p. 45-51, 2003.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 48 (2), p. 422-427, 1972.

HAYASHI, M., *et al.* The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 245 (4), p. 245-249, 1990.

HEINEN, M.M., *et al.* Intake of antioxidant nutrients and the risk of skin cancer. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 43 (18), p. 2707-2716, 2007.

HININGER, I.A., *et al.* No significant effects of lutein, lycopene or beta-carotene supplementation on biological markers of oxidative stress and LDL oxidizability in healthy adult subjects. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 20 (3), p. 232-238, 2001.

HOU, X.M., *et al.* Cisplatin induces loop structures and condensation of single DNA molecules. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37 (5), p. 1400-1410, 2009.

HSU, C.Y., *et al.* Effects of chlorophyll-related compounds on hydrogen peroxide induced DNA damage within human lymphocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53 (7), p. 2746-2750, 2005.

HUBER, R.; STRENG, S.; BAUCHINGER, M. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 111, p. 185-193, 1983.

JACKSON, H.; BRAUN, C.L.; ERNST, H. The chemistry of novel xanthophyll carotenoids. **The American Journal of Cardiology**, New York, v. 101, p. 50D-57D, 2008.

JOHNSON, E.J. The role of carotenoids in human health. Nutrition in clinical care: an official publication of Tufts University. **Nutrition in Clinical Care**, Malden, v. 5 (2), p. 56-65, 2002.

KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, N. Environmental desmutagens and antimutagens. In: KLEKOWSKI, E. J (ed). **Environmental Mutagenesis and Plant Biology**. New York: Praeger, 1982.

KAPADIA, G.J., *et al.* Cancer chemopreventive activity of synthetic colorants used in foods, pharmaceuticals and cosmetic preparations. **Cancer Letter**, Amsterdam, v. 129 (1), p. 87-95, 1998.

KNASMÜLLER, S., *et al.* Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 402 (1-2), p. 185-202, 1998.

KRINSKY, N.I. Carotenoid protection against oxidation. **Pure and Applied Chemistry**, London, v. 51, p. 649-660, 1979.

KRINSKY, N.I. The antioxidant and biological properties of the carotenoids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 854, p. 443-447, 1998.

KRINSKY, N.I.; LANDRUM, J.T.; BONE, R.A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 23, p. 171-201, 2003.

KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford; Elmsford; New York, v. 26 (6), p. 459-516, 2005.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, p. 155-166, 2000.

KRUGER, C.L., *et al.* An innovative approach to the determination of safety for a dietary ingredient derived from a new source: case study using a crystalline lutein product. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford; New York, v. 40 (11), p.1535-1549, 2002.

KURODA, Y., *et al.* Animutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 267, p. 201-209, 1992.

KUSSMANN, M.; PANCHAUD, A.; AFFOLTER, M. Proteomics in nutrition: status quo and outlook for biomarkers and bioactives. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9 (10), p. 4876-4887, 2010.

LANDRUM, J.T.; BONE, R.A. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 385 (1), p. 28-40, 2001.

LANFER-MARQUEZ, U.M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 39 (3), p. 227-242, 2003.

LI, L., *et al.* The role of oxidative stress in acrolein-induced DNA damage in HepG2 cells. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 42 (4), p. 354-361, 2008.

LIENAU, A., *et al.* Bioavailability of lutein in humans from intrinsically labeled vegetables determined by LC-APCI-MS. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 14 (11), p. 663-670, 2003.

LOVELL, D.P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, Oxford, Washington, v. 23 (3), p. 171-182, 2008.

LUI, M.H.; CHEN, B.H. Relationship between chlorophyll a and b-carotene in a lipid-containing model system during heating. **Food Chemistry**, Barking, v. 61, p.41-47, 1998.

LUXFORD, C.; DEAN, R.T.; DAVIES, M.J. Induction of DNA damage by oxidized amino acids and proteins. **Biogerontology**, Dordrecht; Boston, v. 3 (1-2), p. 95-102, 2002.

MACGREGOR, J.T., *et al.* Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 94 (1), 92-107, 2006.

MADHYASTHA, S., *et al.* A comparison of vitamin A and leucovorin for the prevention of methotrexate-induced micronuclei production in rat bone marrow. **Clinics**, Philadelphia, v. 63 (6), p. 821-826, 2008.

MAESTRIN, A.P.J., *et al.* Extração e purificação de clorofila A, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química. **Química Nova**, São Paulo, v. 32 (6), p. 1670-1672, 2009.

MARTIN, K.R.; WU, D.; MEYDANI, M. The effect of carotenoids on the expression of cell surface adhesion molecules and binding of monocytes to human aortic endothelial cells. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 150 (2), p. 265-274, 2000.

MARTINS, V.R., *et al.* Cellular prion protein: on the road for functions. **FEBS letters**, v. 512 (1), p. 25-28, 2002.

MARTINS, N.M., *et al.* Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. **Journal of Applied Toxicology**, Philadelphia, v. 28 (3), p. 337-344, 2008.

MAYNE, S.T. β -Carotene, carotenoids and cancer prevention in humans. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 10, p. 690-701, 1996.

MAZUR, L.; CZYZEWSKA, A.; AUGUSTYNEK, A. WR-2721: inhibitor of cisplatin-induced micronuclei. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, New York, v. 20 (6), p. 349-356, 2000.

MENDONÇA, L.M., *et al.* Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 675, p. 29-34, 2009.

MENDONÇA, L.M., *et al.* Evaluation of curcumin and cisplatin-induced DNA damage in PC12 cells by the alkaline comet assay. **Human and Experimental Toxicology**, London, v. 29 (8), p. 635-643, 2010.

MERK, O.; SPEIT, G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 33, p. 167-172, 1999.

MEYER, K.B.; MEDIAS, N.E. Cisplatin nephrotoxicity. **Mineral and Electrolyte Metabolism**, New York, v. 20, p. 201-213, 1994.

MINGUEZ-MOSQUERA, M.I.; HORNERO-MENDEZ, D.; PEREZ-GALVEZ, A. Carotenoids and provitamin A in functional foods. In: W.J. Hurst, (ed). **Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals**, New York: CRC Press, 2002.

MIRANDA, D.D., *et al.* Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, Oxford; Washington, v. 23 (4), p. 261-265, 2008.

MIYAMOTO, N., *et al.* Quercetin induces the expression of peroxiredoxins 3 and 5 via the Nrf2/NRF1 transcription pathway. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 52 (2), p. 1055-1063, 2011.

MONTAGNANI, F., *et al.* Effectiveness and safety of oxaliplatin compared to cisplatin for advanced, unresectable gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. **Gastric Cancer**. Tokyo, v. 14 (1), p. 50-55, 2011.

MORALES-RAMÍREZ, P.; VALLARINO-KELLY, T.; RODRÍGUEZ-REYES, R. Effect of chlorophyllin on gamma ray induced micronuclei in polychromatic erythrocytes of murine peripheral blood determined by the ABC strategy. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 367 (2), p. 51-56, 1996.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 55-63, 1983.

MÜLLER, M.; KERSTEN, S. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 4 (4), p. 315-322, 2003.

MURIACH, M., *et al.* Lutein prevents the effect of high glucose levels on immune system cells *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Physiology and Biochemistry**, Pamplona, v. 64 (2), p. 149-157, 2008.

NAKAI, T. *et al.* Modulation of oxidative DNA damage and DNA-crosslink formation induced by cis-diammine-tetrachloro-platinum(IV) in the presence of endogenous reductants. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 105 (1), p. 1-5, 2011.

NAKAJIMA, Y., *et al.* Zeaxanthin, a retinal carotenoid, protects retinal cells against oxidative stress. **Current Eye Research**, London, v. 34, p. 311-318, 2009.

NEGRAES, P.D., *et al.* Antoclastogenicity of chlorophyllin in different cell cycle phases in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 557, p.177-182, 2004.

NESSLANY, F., *et al.* *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 630 (1-2), p. 28-41, 2007.

NICOLAS, O.; GAVÍN, R.; DEL RÍO, J. A. New insights into cellular prion protein (PrPc) functions: the "ying and yang" of a relevant protein. **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v. 61 (2), p. 170-184, 2009.

NICOTERA, P.; ORRENIUS, S. **Molecular mechanisms of toxic cell death: An overview**. Academic Press, New York, 1994.

NIKITINA, T.V., *et al.* Use of the real-time RT-PCR method for investigation of small stable RNA expression level in human epidermoid carcinoma cells A431. **Tsitologiia**, Moskva, v. 45 (4), p. 392-402, 2003.

NILES, R.M. The use of retinoids in the prevention and treatment of skin cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, London, v. 3 (3), p. 299-303, 2002.

NISHIKAWA, M., *et al.* Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits nephrotoxicity of cisplatin and increases the survival of cancer-bearing mice. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 171 (2), 133-138, 2001.

OLAS, B.; NOWAK, P.; WACHOWICZ, B. Resveratrol protects against peroxynitrite-induced thiol oxidation in blood platelets. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Versita, v. 9, p. 577-587, 2004.

OLFERT, E.D.; CROSS, B.M.; MCWILLIAM, A.A. **Guide to the care and use of experimental animals**. 2 ed. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1993.

OSHIMA, S., *et al.* Accumulation and clearance of capsanthin in blood plasma after the ingestion of paprika juice in men. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 127 (8), p. 1475-1479, 1997.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 123, p. 291-298, 1984.

OTTO, A.M., *et al.* Cell-cycle arrest, micronucleus formation, and cell death in growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells by tamoxifen and cisplatin. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin; New York, v. 122 (10), p. 603-612, 1996.

PANG, S.K., *et al.* DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 363 (1), p. 235-240, 2007.

PARKER, R.S. Carotenoids in human blood and tissues. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 119 (1), p. 101-104, 1989.

PÉREZ-ROJAS, J.M., *et al.* Renoprotection by alpha-mangostin is related to the attenuation in renal oxidative/nitrosative stress induced by cisplatin nephrotoxicity. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 43 (11), 1122-1132, 2009.

PFUHLER, S., *et al.* Reduction of use of animals in regulatory genotoxicity testing: Identification and implementation opportunities-Report from an ECVAM workshop. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 680 (1-2), p. 31-42, 2009.

PFUHLER, S.; WOLF, H.U. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 27, p. 196-201, 1996.

PLAZAR, J., *et al.* Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of benzo(a)pyrene (BaP), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and tert-butyl

hydroperoxide (t-BOOH) in HepG2 human hepatoma cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 632 (1-2), p.1-8, 2007.

PRÁ, D., *et al.* Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. **Biometals**, Oxford ,v. 2 (3), p. 289-297, 2008.

RABELLO-GAY, N.; RODRIGUES, M.A.R.; MONTELEONE-NETO, R. (eds). **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991.

RAJSKI, S.R.; WILLIAMS, R.M. DNA cross-linking agents as antitumor drugs. **Chemical Reviews**, Easton, v. 98, p. 2723-2795, 1998.

RAMOS, M.E., *et al.* Evaluation of mutagenic effects of formocresol: detection of DNA-protein cross-links and micronucleus in mouse bone marrow. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, St. Louis, v. 105, p. 398-404, 2008.

RHEE, S.G., *et al.* Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxin. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v. 17, p. 183-189, 2005.

RIBEIRO, D.A., *et al.* Genotoxicity of antimicrobial endodontics compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, St. Louis, v. 99, p. 637-640, 2005.

RIBEIRO, J.C., *et al.* Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 95 (1-2), p. 22-28, 2010.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea *in vivo* In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. Ulbra, 2003.

RIBEIRO, L.R., *et al.* Teste do micronúcleo em eritrócito de medula óssea de camundongo. **Série Documentos - SBMCTA Nº. 01 - 2004**. Disponível em: <http://www.sbmcta.org.br/serie-documentos.pdf>. Acesso em: 02 de dezembro de 2009.

RICCIONI, G. Carotenoids and cardiovascular disease. **Current Atherosclerosis Reports**, Philadelphia, v. 11 (6), p. 434-439, 2009.

ROBERTS, R.L.; GREEN, J.; LEWIS, B. Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 27 (2), p. 195-201, 2009.

ROTHFUSS, A., *et al.* Improvement of in vivo genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 723 (2), p. 108-120, 2011.

RT² Profiler™ PCR Array. Disponível em: <http://www.sabiosciences.com/PCRArrayPlate.php>). Acesso em: 02 de dezembro de 2009.

SANTOCONO, M., *et al.* Influence of astaxanthin, zeaxanthin and lutein on DNA damage and repair in UVA-irradiated cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, Lausanne, v. 85 (3), p. 205-215, 2006.

SANTOCONO, M., *et al.* Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, Lausanne, v. 88 (1), p. 1-10, 2007.

SANTOS, N.A., *et al.* Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Berlin; New York, v. 61 (1), p. 145-155, 2008.

SARKAR, D.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Chlorophyll and chromosome breakage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 360 (3), p. 187-191, 1996.

SASAKI, Y.F., *et al.* The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 30 (6), p. 629-799, 2000.

SATHISHKUMAR, K., *et al.* Cholesterol secoaldehyde induces apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts through reactive oxygen species involving mitochondrial and death receptor pathways. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 47 (5), p. 548-558, 2009.

SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. **Journal of Dentistry**, Bristol, v. 22, p. 6-11, 1994.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31, p. 9-15, 1975.

SCHOSTAK, M., *et al.* Quantitative real-time RT-PCR of CD24 mRNA in the detection of prostate cancer. **BMC Urology**, London, v. 15, p. 6-7, 2006.

SCHWARTZ, S.J.; LORENZO, T.V. Chlorophylls in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 29 (1), p. 1-17, 1990.

SCHWEIGERT, F.J. Metabolism of carotenoids in mammals. In: Britton, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Ed). **Carotenoids**. Berlin: Birkhäuser Verlag, 1998.

SCORRANO, L.; KORSMEYER, S.J. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 304, p. 437-444, 2003.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25 (1), 192-205, 1968.

SENDÃO, M.C., *et al.* Comparative effects of acute and subacute lycopene administration on chromosomal aberrations induced by cisplatin in male rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford; New York, v. 44 (8), p. 1334-1339, 2006.

SERKIES, K.; WĘGRZYNOWICZ, E.; JASSEM, J. Paclitaxel and cisplatin chemotherapy for ovarian cancer during pregnancy: case report and review of the literature. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, München, v. 1, p. 97-100, 2011.

SERPELONI, J.M., *et al.* *In vivo* assessment of DNA damage and protective effects of extracts from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test. **Mutagenesis**, Oxford; Washington, v. 23 (6), p. 501-507, 2008.

SERPELONI, J.M., *et al.* Lutein improves antioxidant defense in vivo and protects against DNA damage and chromosome instability induced by cisplatin. **Archives of Toxicology**, Berlin, New York, v. 84 (10), p. 811-822, 2010.

SERPELONI, J.M., *et al.* An evaluation, using the comet assay and the micronucleus test, of the antigenotoxic effects of chlorophyll b in mice. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 725 (1-2), p. 50-56, 2011.

SHAO, A.; HATHCOCK, J.N. Risk assessment for the carotenoids lutein and lycopene. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 45, (3), p. 289-298, 2006.

SHARONI, Y., *et al.* Modulation of transcriptional activity by antioxidant carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 24 (6), p. 371-384, 2003.

SHIOTA, M., *et al.* Ets regulates peroxiredoxin1 and 5 expressions through their interaction with the high-mobility group protein B1. **Cancer Science**, Tokyo, v. 99 (10), p. 1950-1959, 2008.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, Tucson, v. 30 (91), p. 31S-38S, 1991.

SINDHU, E.R.; PREETHI, K C.; KUTTAN, R. Antioxidant activity of carotenoid lutein *in vitro* and *in vivo*. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 48 (8), p. 843-848, 2010.

SINGH, N.P., *et al.* simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 175, p. 184-191, 1988.

SLESINSKI, R.S.; GUZZIE, P.J. Review of recent advances in the development and application of the micronucleus test system. In: BALLANTYNE, B. **Perspectives in Basic and Applied Toxicology**. London: Wright, 1988.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição PUCCAMP**, Campinas, v. 15, p. 71-79, 2002.

SOMMERBURG, O., *et al.* Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 82 (8), p. 907-910, 1998.

SORENSEN, J.R. Prion diseases: copper deficiency states associated with impaired nitrogen monoxide or carbon monoxide transduction and translocation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 87, p. 125-127, 2001.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1740 (2), p. 101-107, 2005.

STORHOFF, J.J., *et al.* Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. **Nature Biotechnology**, New York, v. 22 (7), p. 883-887, 2004.

TAGUCHI, T., *et al.* Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. **Contributions to Nephrology**, Basel, New York, v. 148, p. 107-121, 2005.

TANG, X.; EDENHARDER, R. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by vitamins, porphyrins and related compounds, and vegetable and fruit juices and solvent extracts. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford; New York, v. 35 (3-4), p. 373-378, 1997.

TENTORI, L.; SALVATI, A.M. Hemoglobinometry in human blood. **Methods in Enzymology**, New York, v. 76, p. 707-715, 1981.

THOMAS, *et al.* Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. **Mutagenesis**, Oxford; Washington, v. 26 (1), p. 69-76, 2011.

TICE, R.R., *et al.* The single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, p. 206-221, 2000.

TICE, R.R.; STRAUSS, G.H. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. **Stem Cells**, Basel; New York, v. 13 (1), 207-214, 1995.

TITENKO-HOLLAND, N., *et al.* Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 388 (1), p. 85-95, 1997.

TRUJILLO, E.; DAVIS, C.; MILNER, J. Nutrigenomics, proteomics, metabolomics, and the practice of dietetics. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 106, p. 403-413, 2006.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Bcl-2 family: life-or-death switch. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 466, p. 6-10, 2000.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 86, p. 271-278, 1978.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMUELLER, S. Single cell gel electrophoresis assays with human derived hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 441, p. 215-224, 1999.

VALKO, M., *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 160, p. 1-40, 2006.

VENKATESH, P., *et al.* Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: A micronucleus study. **Integrative Cancer Therapies**, Thousand Oaks, v. 6, p. 42-53, 2007.

WANG, C., *et al.* Effect of ascorbic acid and thiamine supplementation at different concentrations on lead toxicity in liver. **The Annals of Occupational Hygiene**, Oxford; New York, v. 51, p. 563-569, 2007.

WANG, M., *et al.* Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford; New York, v. 44 (9), 1522-1529, 2006.

WARNER, J.R.; NATH, J.; ONG, T.M. Antimutagenicity studies of chlorophyllin using the *Salmonella* arabinose-resistant assay system. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 262 (1), p. 25-30, 1991.

WESCOTT, D.C. *et al.* Osteogenic Gene Expression by Human Periodontal Ligament Cells under Cyclic Tension. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 86 (12), p. 1212-1216, 2007.

WILBORN, C.D., *et al.* Effects of zinc magnesium aspartate (ZMA) supplementation on training adaptations and markers of anabolism and catabolism. **International Society of Sport Nutrition**, Woodland Park, v. 1, p. 12-20, 2004.

WINTER, H.K., *et al.* Use of four new human-derived liver-cell lines for the detection of genotoxic compounds in the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 657 (2), p. 133-139, 2008.

WOLFSEGGGER, M.J., *et al.* A note on statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 240 (1), p. 117-122, 2009.

WOZNIAK, K.; CZECHOWSKA, A.; BLASIAK, J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 147 (3), p. 309-318, 2004.

XIE, J.; FAN, R.; MENG, Z. Protein oxidation and DNA-protein crosslink induced by sulfur dioxide in lungs, livers, and hearts from mice. **Inhalation Toxicology**, New York, v. 19 (9), p. 759-765, 2007.

XU, J., *et al.* Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford; New York, v. 46 (5), p. 1488-1494, 2008.

YEMELYANOV, A.Y.; KATZ, N.B.; BERNSTEIN, P.S. Ligand-binding characterization of xanthophyll carotenoids to solubilized membrane proteins derived from human retina. **Experimental Eye Research**, London, v. 72 (4), p. 381-392, 2001.

YOUNG, A.J.; LOWE, G.M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 385, p. 20-27, 2001.

ZALACAIN, M.; SIERRASESUMAGA, L.; PATINO, A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, London, v. 28, p. 227-236, 2005.

ZUBKOVA, E.V.; ROBAIRE, B. Effect of glutathione depletion on antioxidant enzymes in the epididymis, seminal vesicles, and liver and on spermatozoa motility in the aging brown norway rat. **Biology of Reproduction**, New York, v. 71 (3), p. 1002-1008, 2004.

ANEXOS

7. Anexos

7.1 Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 08.1.1561.53.6), intitulado: "Atividade Antigenotóxica de Compostos da Dieta e sua Influência na Expressão de Genes de Resposta ao Estresse Oxidativo", de autoria de **Juliana Mara Serpeloni** e de **Lusânia Maria Greggi Antunes**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 04/02/2009.

Ribeirão Preto, 4 de fevereiro de 2009

Presidente da CEUA em exercício
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

7.2 Tabela de Genes Avaliados na Técnica de PCR Array

Position	GeneBank	Symbol	Description
A01	NM_027127	Gpx8	Glutathione peroxidase 8 (putative)
A02	NM_013930	Aass	Amino adipate-semialdehyde synthase
A03	NM_028717	Als2	Amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) homolog (human)
A04	NM_007462	Apc	Adenomatous polyposis coli
A05	NM_009696	Apoe	Apolipoprotein E
A06	NM_009702	Aqr	Aquarius
A07	NM_019864	Atr	Ataxia telangiectasia and rad3 related
A08	NM_009804	Cat	Catalase
A09	NM_016892	Ccs	Copper chaperone for superoxide dismutase
A10	NM_001081339	Xirp1	Xin actin-binding repeat containing 1
A11	NM_007798	Ctsb	Cathepsin B
A12	NM_007806	Cyba	Cytochrome b-245, alpha polypeptide
B01	NM_030206	Cygb	Cytoglobin
B02	NM_001039520	Dnm2	Dynamin 2
B03	XM_130483	Duox1	Dual oxidase 1
B04	NM_153068	Ehd2	EH-domain containing 2
B05	NM_007946	Epx	Eosinophil peroxidase
B06	NM_007949	Ercc2	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
B07	NM_001081221	Ercc6	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6
B08	NM_007985	Fancc	Fanconi anemia, complementation group C
B09	NM_018881	Fmo2	Flavin containing monooxygenase 2
B10	NM_021356	Gab1	Growth factor receptor bound protein 2-associated protein 1
B11	NM_008160	Gpx1	Glutathione peroxidase 1
B12	NM_030677	Gpx2	Glutathione peroxidase 2
C01	NM_008161	Gpx3	Glutathione peroxidase 3
C02	NM_008162	Gpx4	Glutathione peroxidase 4
C03	NM_010343	Gpx5	Glutathione peroxidase 5
C04	NM_145451	Gpx6	Glutathione peroxidase 6
C05	NM_024198	Gpx7	Glutathione peroxidase 7
C06	NM_010344	Gsr	Glutathione reductase
C07	NM_029555	Gstk1	Glutathione S-transferase kappa 1
C08	NM_175000	Hbq1	Hemoglobin, theta 1
C09	NM_010497	Idh1	Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble
C10	NM_026298	Ift172	Intraflagellar transport 172 homolog (Chlamydomonas)
C11	NM_001009940	Il19	Interleukin 19
C12	NM_016971	Il22	Interleukin 22
D01	NM_010628	Kif9	Kinesin family member 9
D02	NM_080420	Lpo	Lactoperoxidase
D03	NM_013593	Mb	Myoglobin
D04	NM_010824	Mpo	Myeloperoxidase
D05	NM_145143	Mpp4	Membrane protein, palmitoylated 4 (MAGUK p55 subfamily member 4)
D06	NM_010877	Ncf2	Neutrophil cytosolic factor 2
D07	NM_022414	Ngb	Neuroglobin
D08	NM_010927	Nos2	Nitric oxide synthase 2, inducible
D09	NM_172203	Nox1	NADPH oxidase 1
D10	NM_015760	Nox4	NADPH oxidase 4
D11	NM_172204	Noxa1	NADPH oxidase activator 1
D12	NM_027988	Noxo1	NADPH oxidase organizer 1
E01	NM_008706	Nqo1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
E02	NM_172527	Nudt15	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 15
E03	NM_008750	Nxn	Nucleoredoxin
E04	NM_020569	Park7	Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7
E05	NM_133819	Ppp1r15b	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15b
E06	NM_011034	Prdx1	Peroxiredoxin 1
E07	NM_011563	Prdx2	Peroxiredoxin 2
E08	NM_007452	Prdx3	Peroxiredoxin 3
E09	NM_016764	Prdx4	Peroxiredoxin 4
E10	NM_012021	Prdx5	Peroxiredoxin 5

E11	NM_007453	Prdx6	Peroxiredoxin 6
E12	NM_177256	Prdx6-rs1	Peroxiredoxin 6, related sequence 1
F01	NM_011170	Prnp	Prion protein
F02	NM_011186	Psmb5	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 5
F03	NM_008969	Ptgs1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1
F04	NM_011198	Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
F05	NM_009020	Rag2	Recombination activating gene 2
F06	NM_058214	Recql4	RecQ protein-like 4
F07	NM_009127	Scd1	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1
F08	NM_173052	Serpinb1b	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1b
F09	NM_134086	Slc38a1	Solute carrier family 38, member 1
F10	NM_027868	Slc41a3	Solute carrier family 41, member 3
F11	NM_011434	Sod1	Superoxide dismutase 1, soluble
F12	NM_013671	Sod2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial
G01	NM_011435	Sod3	Superoxide dismutase 3, extracellular
G02	NM_029688	Srxn1	Sulfiredoxin 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
G03	NM_021883	Tmod1	Tropomodulin 1
G04	NM_009417	Tpo	Thyroid peroxidase
G05	NM_023719	Txnip	Thioredoxin interacting protein
G06	NM_015762	Txnrd1	Thioredoxin reductase 1
G07	NM_013711	Txnrd2	Thioredoxin reductase 2
G08	NM_153162	Txnrd3	Thioredoxin reductase 3
G09	NM_009464	Ucp3	Uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)
G10	NM_011701	Vim	Vimentin
G11	NM_011728	Xpa	Xeroderma pigmentosum, complementation group A
G12	XM_127602	Zmynd17	Zinc finger, MYND domain containing 17
H01	NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta
H02	NM_013556	Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1
H03	NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1
H04	NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H05	NM_007393	Actb	Actin, beta
H06	SA_00106	MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination
H07	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	SA_00103	PPC	Positive PCR Control