

UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E TOXICOLOGIA  
APLICADA



**Estudo da atividade bioantimutagênica do licopeno em células  
somáticas de *Drosophila melanogaster***

Dissertação para obtenção do  
título de Mestre em Genética e  
Toxicologia Aplicada

**MARINÊS PÉRSIGO MORAIS RIGO**

**Orientador: Dr. Mauricio Lehmann**

**CANOAS  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Toxicidade Genética (TOXIGEN) da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu pai e minha mãe, pelo incentivo, compreensão, paciência, apoio e carinho. Minha eterna gratidão!

Ao meu querido marido Fernando, alguém muito especial em minha vida, pela compreensão nos dias difíceis, pela paciência, carinho e amor.

As minhas duas filhas: Gabriela e Giovana, que são a razão da minha vida, é por elas e para elas que estou aqui hoje. Amo vocês.

Ao meu cunhado Leandro e principalmente a minha querida irmã Ecléa pela amizade, carinho e grandes momentos de conversas e cumplicidades.

Ao meu irmão, minha cunhada Eliana e minhas sobrinhas, que mesmo longe sempre torceram por mim.

Aos meus avós que sempre torceram pela minha felicidade e que mesmo de longe me apoiaram e são responsáveis pela minha conquista.

A minha tata Norma, que sempre disposta, cuidou com carinho e amor das minhas filhas para eu poder estudar e me dedicar ao meu mestrado.

Ao meu sogro e minha sogra, pelo carinho e principalmente pelo incentivo.

A minha querida cunhada Flávia, pelas dicas, orientações, conversas e pela amizade sincera. Muito obrigada.

A todos do Laboratório de TOXIGEN que me ajudaram muito nesta conquista: Samantha, Judite, Ronaldo e Bruno. A vocês muito obrigado de coração.

E a todos os demais, que de uma forma ou de outra colaboraram para realização deste trabalho, muito obrigado.

Ao meu orientador Maurício Lehmann, por todos os ensinamentos, conselhos, orientações, paciência e acima de tudo pela confiança e oportunidade de crescimento.

Ao professor Rogério Porscher, que permitiu que eu fizesse as leituras na UNIVATES – Lajeado-RS, facilitando o desenvolvimento do meu trabalho. Muito obrigada.

A todos meus colegas de Mestrado, pelo convívio, amizade, dicas e pelos momentos alegres que passamos juntos.

A Deus, pela vida, saúde e oportunidades. Obrigada por tudo!

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram  
mas na intensidade com que acontecem.  
Por isso existem momentos inesquecíveis,  
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.  
(Fernando Pessoa)

Só depende de nós...

"Hoje levantei cedo pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite. É minha função escolher que tipo de dia vou ter hoje.

Posso reclamar porque está chovendo ou agradecer às águas por lavarem a poluição.

Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas finanças, evitando o desperdício.

Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo.

Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado tudo o que eu queria ou posso ser grato por ter nascido.

Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho.

Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus por ter um teto para morar.

Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades.

Se as coisas não saíram como planejei posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar.

O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser. E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma.

Tudo depende só de mim."

(Charles Chaplin)

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>CAPÍTULO I. Introdução Geral</b> .....	9
1.1 Carotenóides.....	11
1.2 Licopeno .....	12
1.3 Biodisponibilidade do licopeno.....	15
1.4 Ação protetora do licopeno .....	17
1.5 Objetivos .....	20
<b>CAPÍTULO II. Investigation of the bioantimutagenic activity of lycopene in somatic cells of <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	22
<b>CAPÍTULO III. Discussão Geral</b> .....	40
3.1 Conclusões.....	47
<b>CAPÍTULO IV. Bibliografia Geral</b> .....	49

## RESUMO

Estudos epidemiológicos fornecem evidências de que o alto consumo de tomate reduz de forma efetiva o risco de doenças relacionadas com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o câncer. O tomate e seus derivados são fontes ricas de licopeno (LIC), um carotenóide que possui elevada capacidade de sequestrar o oxigênio singlete. Além de sua ação antioxidante, o LIC apresenta outras atividades biológicas, que incluem cardioproteção, ação antiinflamatória, antimutagênica e anticarcinogênica. Embora a atividade protetora do LIC em relação aos danos induzidos por diferentes mutágenos tenha sido observada em diversos trabalhos experimentais, até o momento não foram realizados estudos com o objetivo de investigar a atividade moduladora deste carotenóide sobre recombinação homóloga, um mecanismo envolvido na perda de heteroziguidade. Desta forma, o presente estudo foi delineado para avaliar a atividade bioantimutagênica do LIC em relação aos danos induzidos pelo etilmetanossulfonato (EMS) e mitomicina C (MMC), utilizando o teste para detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster*. Este bioensaio permite a detecção simultânea e a quantificação de recombinação mitótica em relação à mutação gênica e cromossômica através da análise dos genótipos trans-heterozigoto para os genes marcadores *mwh* e *flr<sup>3</sup>* (*mwh/flr<sup>3</sup>*) e heterozigotos para o cromossomo *TM3* (*mwh/TM3*). Os dados obtidos através do sistema de pós-tratamento evidenciaram que o LIC (0,06 e 0,12%) não altera a mutagenicidade e a recombinogenicidade do EMS e MMC em ambos os genótipos. Além disso, os resultados mostraram que o LIC não interferiu na proporção entre danos recombinogênicos/mutacionais, sugerindo que este carotenóide não interfere nos mecanismos de reparo envolvidos na correção das lesões induzidas por estes agentes alquilantes.

## ABSTRACT

Epidemiological studies have provided evidence that high consumption of tomatoes effectively reduces the risk of reactive oxygen species (ROS)-mediated diseases such as cancer. Tomatoes are rich sources of lycopene, a potent singlet oxygen-quenching carotenoid. In addition to its antioxidant properties, lycopene shows an array of biological effects that include cardioprotective, anti-inflammatory, antimutagenic and anticarcinogenic activities. In spite of the fact that several experimental studies pointed out the protective activity of LYC against different mutagens, no studies have yet been designed to investigate the LYC modulatory activity over homologous recombination (HR), a mechanism involved in the loss of heterozygosity (LOH). Using the SMART *Drosophila* wing-spot bioassay, the present study was designed to evaluate the bioantimutagenic activity of lycopene on the DNA damage induced by ethylmethanesulphonate (EMS) and mitomycin C (MMC). This bioassay allows the simultaneous detection and quantification of mitotic recombination versus gene and chromosomal mutations by the analysis of trans- (*mwh/flr<sup>3</sup>*) and balancer- heterozygous (*mwh/TM3*) genotypes. The results showed that LYC (0.06 and 0.12%) did not modify the mutagenicity and the recombinogenicity of EMS and MMC by means of post-treatment protocol on both genotypes. Additionally, these results indicate that LYC does not interfere with the proportion of recombinogenic/mutagenic genotoxic lesions, indicating that this carotenoid does not seem to interfere with the repair mechanisms involved in the correction of the DNA lesions induced by these alkylating agents.

# CAPÍTULO I

## 1. Introdução Geral

A preocupação com a ação dos antioxidantes e a sua relação com os radicais livres (espécies reativas) se tornou essencial à compreensão de algumas patologias. Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções importantes no metabolismo. As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólitos (Mendez Filho e Rodrigues, 1997; Maxwell e Greig, 2001; Reynolds et al., 2007).

O termo espécies reativas de oxigênio (EROs) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do  $O_2$ , como o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), mas também alguns não-radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) (Halliwell e Gutteridge, 1999). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), sendo o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) os principais representantes. As EROs e ERNs ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos do organismo. Assim, o aumento na liberação de radicais livres no organismo pode ser benéfico, como é o caso de espécies tóxicas oxidantes produzidas pelos neutrófilos, que podem atuar na defesa do hospedeiro contra uma infecção (Delanty e Dichter, 1998; Halliwell e Gutteridge, 1999), além dos processos de sinalização celular, síntese e regulação de algumas proteínas (Ward e Peters, 1995). Por outro lado, quando formadas em excesso, essas espécies altamente reativas têm o potencial

de oxidar moléculas e como conseqüência promover a lipoperoxidação e oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), reagir com proteínas, levando à sua inativação, e conseqüentemente alterar a sua função, e ainda atuar sobre o DNA e RNA, gerando mutações somáticas e distúrbios no processo de transcrição, entre outros efeitos (Delanty e Dichter, 1998; Halliwell e Whiteman, 2004).

Os danos oxidativos em biomoléculas podem levar à inativação enzimática, mutação, ruptura de membrana, aumento na aterogenicidade de LDL e morte celular. Estes efeitos tóxicos do oxigênio têm sido associados ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças crônicas, inflamatórias e degenerativas (Halliwell e Gutteridge, 1999; Flora, 2007). Buzzini e Matsudo (1990) relatam que os radicais livres estão envolvidos em aproximadamente 40 doenças, entre as quais o câncer e a aterosclerose, as duas principais causas de morte. Os efeitos tóxicos dos radicais livres estão relacionados com doenças como porfirias, cataratas, sobrecarga de ferro e cobre, doença de Alzheimer, diabetes, inflamações crônicas, doenças auto-imunes e situações de injúria por isquemia. Além disso, a ação dos radicais livres sobre o DNA, RNA e proteínas pode gerar citotoxicidade, alergias, alterações genéticas e/ou desenvolvimento de tumores, dependendo da concentração de exposição (Matés et al., 1999; Valko et al., 2007).

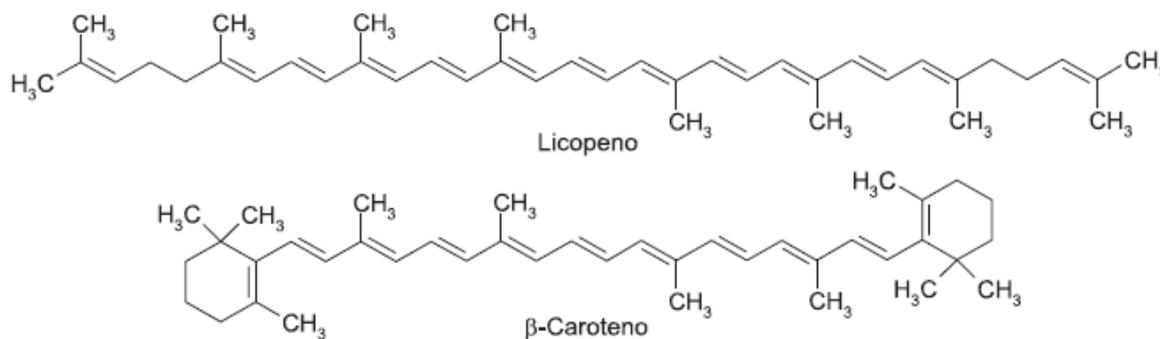
Apesar de apresentarem vários mecanismos de defesa endógenos contra a indução de danos oxidativos, as células não ficam totalmente protegidas dos efeitos danosos descritos acima. Desta forma, está amplamente descrito na literatura que antioxidantes obtidos da dieta são indispensáveis para a proteção dos componentes celulares e, portanto, têm importante papel na manutenção da

homeostase celular. Os incontestáveis benefícios para a saúde associados ao consumo de frutas e hortaliças devem-se, em parte, à presença de antioxidantes nos alimentos, entre os quais se destacam os carotenóides. De fato, estes compostos têm sido alvo de interesse de pesquisadores, profissionais da área da saúde e agências regulatórias em função do seu importante papel na prevenção de doenças crônicas (Rao e Rao, 2007).

### 1.1 Carotenóides

Carotenóides são isoprenóides, geralmente constituídos por 8 unidades de isoprenos, formando uma longa cadeia de polieno que pode conter de 2 a 15 duplas ligações conjugadas, o que permite várias configurações *cis* e *trans*. São amplamente distribuídos na natureza, sintetizados exclusivamente em plantas e responsáveis pela coloração de frutas e hortaliças (Moritz e Tramonte, 2006).

Foram identificados cerca de 600 carotenóides embora apenas 20 sejam encontrados em tecidos humanos provenientes da dieta. Destes, os principais e mais comuns são os hidrocarbonetos licopeno (LIC) e beta-caroteno (Figura 1) (El-Agamey et al., 2004).



**Figura 1.** Estrutura do licopeno e beta-caroteno (modificado de Cerqueira et al., 2007).

As concentrações plasmáticas de carotenóides são boas indicadoras do consumo de frutas e hortaliças; evidências epidemiológicas associam altos níveis plasmáticos de beta-caroteno e outros carotenóides com a diminuição de câncer e doenças cardiovasculares. As propriedades antioxidantes destes elementos fundamentam-se na sua estrutura, principalmente no sistema de duplas ligações conjugadas, tornando possível a captação de radicais livres, principalmente o radical alquilperoxila (ROO•) (Young e Lowe, 2001).

Estudo realizado por Amotz e Fishler (1998) demonstrou a presença de carotenóides em frutas, como mamão papaia, pitanga, manga e vegetais, como tomate, alface, cenoura, entre outros. As frutas e os vegetais vermelhos contêm principalmente o LIC, enquanto que as frutas e os vegetais amarelos e alaranjados tem índices elevados de carotenóides, criptoxantinas e xantofilas, e os vegetais verdes são ricos em xantofilas e carotenóides.

## **1.2 Licopeno**

O tomate (*Lycopersicon esculentum*) é um dos frutos mais consumidos no mundo ocidental e passou a despertar a atenção dos pesquisadores após a divulgação de estudos epidemiológicos que constataram redução no risco de desenvolvimento de câncer de próstata e do aparelho digestivo após o consumo de produtos feitos a partir deste fruto. A sua presença na dieta alimentar também tem sido associado a uma baixa mortalidade por doenças cardiovasculares em populações da região mediterrânea (Tyssandier et al., 2004) e outros estudos também sugerem que o consumo de tomate diminui o risco de doenças crônicas

(Weisburger, 2002; Willcox et al., 2003). Entre os diferentes micronutrientes presentes no tomate encontram-se: folato, minerais, potássio, carotenóides, vitamina C, vitamina A, vitamina E, flavonóides e fitoesteróis (Tabela 1). Destes, os mais abundantes fitonutrientes são os carotenóides, sendo o LIC presente em 80% da sua composição (Kirsh et al., 2006). A produção de tomate no Brasil é de aproximadamente 3 milhões de toneladas/ano, sendo 65% destinado ao consumo *in natura* e 35% para processamento industrial. Isto equivale dizer que são produzidas anualmente cerca de 1.500 t da molécula de LIC na safra brasileira (assumindo teores médios de 50 µg/g) (Carvalho et al., 2005). De forma geral, tomate e seus produtos alimentícios derivados contribuem com pelo menos 85% do LIC proveniente da dieta em humanos. Os restantes 15% são normalmente obtidos do melão, pomelo, goiaba e mamão (Tabela 2) – todos estes frutos são fontes naturais de LIC, porém em níveis muito inferiores ao tomate (Bohm e Bitsch, 1999).

O pigmento licopeno ( $C_{40}H_{56}$ , Figura 1) pertence ao subgrupo dos carotenóides não oxigenados, sendo caracterizado por uma estrutura acíclica e simétrica (Rao, 2002). É um carotenóide lipossolúvel composto por onze ligações conjugadas e duas ligações duplas não conjugadas. É o carotenóide que possui a maior capacidade de seqüestro do oxigênio singleto, possivelmente devido à presença das duas ligações duplas não conjugadas o que lhe garante maior reatividade. Tomates e derivados, como sucos, sopas, molhos e catchup, aparecem como as maiores fontes alimentares de LIC (Shami e Moreira, 2004). Entre uma série de carotenóides avaliados, o LIC foi um dos mais eficientes antioxidantes, podendo doar elétrons para neutralizar moléculas de oxigênio

singleto assim como outras moléculas oxidantes (Rao e Agarwal, 1998; Rao e Agarwal, 2000; Heber e Lu, 2002).

**Tabela 1.** Micronutrientes do tomate in natura (modificado de Gould, 1992).

<b>Nutriente</b>	<b>Quantidade por 100g</b>
<b><i>Minerais</i></b>	
Cálcio	10,0 mg
Ferro	0,27 mg
Magnésio	11,0 mg
Fósforo	24,0 mg
Potássio	23,7 mg
Sódio	5,0 mg
<b><i>Vitaminas</i></b>	
Vitamina A	833 UI
Vitamina C	12,7 mg
Vitamina E	0,54 mg
<b><i>Carotenóides</i></b>	
Licopeno	2.573 µg
Beta-caroteno	449 µg
Alfa-caroteno	101 µg

É interessante salientar que alguns trabalhos mais recentes indicam que a ingestão do tomate e derivados é mais eficiente na prevenção de certos tipos de câncer do que a administração do LIC purificado, apesar de apresentar um maior nível plasmático. É sugerido que outros compostos presentes neste fruto possam contribuir para a inibição da carcinogênese (Boileau et al., 2003).

**Tabela 2.** Conteúdo de licopeno em alguns alimentos (modificado de Levy e Sharoni, 2004).

<b>Tipo de alimento</b>	<b>Quantidade em mg/100g</b>
Goiaba fresca	5,4
Tomate fresco	3,1 – 7,7
Suco de tomate	7,8
Pasta de tomate	30,0
Pomelo fresco	3,36
Melão fresco	4,1
Catchup	16,6
Molho de pizza	32,9
Molho de espaguete	17,5
Papaia fresco	2,0 – 5,3

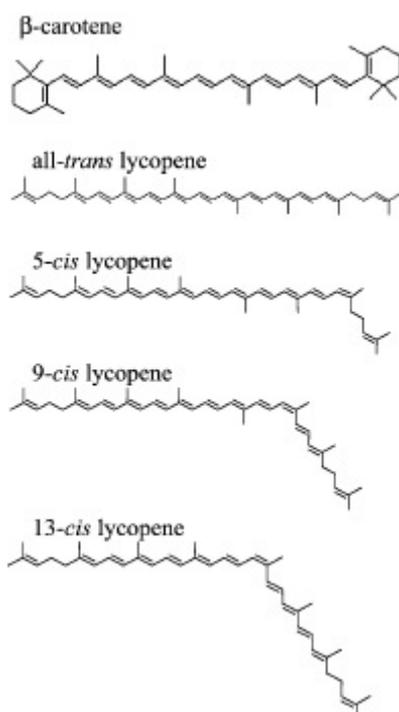
### **1.3 Biodisponibilidade do licopeno**

O LIC está presente no plasma e tecido humano ainda que haja uma grande variação na sua distribuição. Sabe-se, desde 1990, que carotenóides e seus metabólitos estão presentes no soro ou acumulados em tecidos, como fígado, pulmão, mama, coluna cervical e na pele. Entre os carotenóides, o LIC é um dos mais abundantes no corpo humano devido, principalmente, ao consumo de alimentos (Heber e Lu, 2002; Khachik et al., 2002).

Em relação à biodisponibilidade, verificou-se que o consumo de molho de tomate aumenta as concentrações séricas de LIC em taxas maiores do que o consumo de tomates crus ou suco de tomate fresco. A ingestão de molho de tomate cozido em óleo resultou em um aumento de 2 a 3 vezes na concentração

sérica do LIC um dia após sua ingestão, mas nenhuma alteração ocorreu quando se administrou suco de tomate fresco (Gartner et al., 1997).

Essa diferença de biodisponibilidade está relacionada com as formas isoméricas apresentadas pelo LIC (Figura 2). Clinton et al. (1996) demonstraram que 79% a 91% deste carotenóide presente nos tomates e seus produtos encontram-se sob a forma do isômero *trans* (*trans*-licopeno), em contraste com os níveis de LIC sérico e tissulares, que se encontram, em mais de 50%, na forma de isômero *cis* (*cis*-licopeno). O LIC ingerido na forma natural (*trans*-licopeno) é pouco absorvido, mas o processamento térmico dos tomates e seus produtos melhora a sua biodisponibilidade. Este processo rompe a parede celular e permite a extração do LIC dos cromoplastos.



**Figura 2.** Estrutura do beta-caroteno, licopeno e seus isômeros (modificado de Unlu et al., 2007).

#### **1.4 Ação protetora do licopeno**

O consumo de alimentos ricos em LIC bem como uma maior concentração deste carotenóide no sangue foram associados a um menor risco de câncer, principalmente de próstata. O LIC é encontrado na próstata humana, sugerindo um efeito direto deste carotenóide na função deste órgão e na carcinogênese (Willis e Wians, 2003).

Michaud et al. (2000) relatam que a ingestão de carotenóides reduz em 32% o risco de câncer de pulmão em não fumantes, enquanto uma maior ingestão de alfa-caroteno diminui em 63% este mesmo risco. Em fumantes, no entanto, a redução do risco era insignificante para os demais antioxidantes, exceto para o LIC, que apresenta maior eficiência na proteção das membranas celulares contra as lesões causadas pelo radical dióxido de nitrogênio encontrado no fumo.

Existem evidências de que o consumo de tomates e de seus produtos está associado à redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares. Sua proteção recai sobre lipídios, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), proteínas e DNA (Rao e Agarwal, 1998). Da mesma forma, estudos clínicos e epidemiológicos têm confirmado que dietas ricas em LIC estão associadas com a redução do risco de desenvolvimento de câncer de próstata, de ovário, gástrico e pancreático (Kavanaugh et al., 2007), bem como a uma menor incidência de doenças degenerativas crônicas e cardiovasculares (Nguyen e Schwartz, 1999; Cramer et al., 2001; Rao, 2002; Khan et al., 2008).

Apesar destes achados, a *Food and Drug Administration* (FDA), agência norte-americana que regulamenta o setor de remédios e alimentos nos Estados

Unidos, publicou uma recente revisão descrevendo não haver encontrado evidências que suportem a associação entre o consumo de LIC e um menor risco de aparecimento de câncer de próstata, de pulmão, coloretal, gástrico, de mama, ovariano, endometrial e pancreático, assim como não encontrou dados que comprovem a associação entre o consumo de tomate e redução no risco de aparecimento de câncer de pulmão, coloretal, de mama, cervical e endometrial. Entretanto, encontrou fracas evidências de associação entre o consumo de tomate e redução do risco de desenvolvimento de câncer de próstata, de ovário, gástrico e pancreático (Kavanaugh et al., 2007).

Além de sua atividade anticarcinogênica, vários estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* caracterizam o LIC com um agente capaz de proteger as células contra danos oxidativos e genéticos (McClain e Bausch, 2003). Neste sentido, ficou comprovado que este carotenóide possui um potente efeito protetor nos espermatozoides e no tecido testicular sobre o estresse oxidativo causado pela ciclosporina-A e cisplatina em ratos Sprague-Dawley (Atessahin et al., 2006; Türk et al., 2007). Resultados semelhantes foram encontrados neste mesmo modelo experimental, onde foi avaliada a atividade protetora do LIC sobre a nefrotoxicidade e estresse oxidativo induzidos pela cisplatina nos sistemas de pré- e pós-tratamento. Os efeitos moduladores mais significativos foram encontrados quando o LIC foi administrado antes do agente estressor (Atessahin et al., 2005). Tang et al. (2007) também realizaram estudos com ratos, porém da linhagem F344, demonstrando que o pré-tratamento com este composto reduziu significativamente o efeito tóxico causado pela aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>).

Para comprovar o efeito protetor, o LIC também foi testado em combinação com outras substâncias, como a S-alilcisteína (SAC) em ratos Wistar e camundongos albinos Swiss sobre a indução de mutagenicidade pelo carcinógeno N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), através do teste de micronúcleos em células da medula óssea. Constatou-se que as duas substâncias antioxidantes são agentes protetores eficazes quanto aos efeitos clastogênicos e à carcinogenicidade, principalmente quando usados em combinação (Velmurugan et al., 2004, 2005).

Ao avaliar o efeito protetor do LIC sobre os danos genéticos induzidos pela radiação gama em cultura de hepatócitos de ratos, através do teste cometa, Srinivasan et al. (2007) demonstraram que este composto foi um excelente radioprotetor quando administrado antes da indução dos danos. Em cultura de células de carcinoma de cólon HT-29, avaliadas através do teste Cometa, baixas concentrações de LIC foram capazes de reduzir os danos oxidativos induzidos pela xantina e xantina oxidase (Lowe et al., 1999). Da mesma forma, ao ser administrado em células humanas de carcinoma de cólon (HCT116), deficientes no sistema de reparo de mau pareamento (*mismatch*), o LIC foi capaz de reduzir em 70% a frequência de mutações espontâneas (Mure e Rossman, 2001).

Alguns estudos avaliaram a atividade antígeno-tóxica e antimutagênica do LIC na forma de oleoresina, da mesma procedência que a utilizada neste estudo, em bioensaios *in vivo* e *in vitro* (Sendão et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Scolastici et al., 2007, 2008a). Foi verificado que o LIC administrado na forma de oleoresina de tomate, após o tratamento com doxorubicina, foi capaz de reduzir as lesões no DNA induzidas por este fármaco em células cardíacas de ratos

Wistar tratados via gavagem, avaliadas através do teste cometa (Ferreira et al., 2007). Utilizando os mesmos organismos experimentais e a mesma forma de administração, Sendão et al. (2006) observaram que o LIC reduziu a incidência de micronúcleos em linfócitos da medula óssea induzidos pela cisplatina tanto em tratamentos agudos como subagudos. Nos bioensaios *in vitro*, com células de ovário de hamster chinês (CHO) e células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), o LIC foi capaz de exercer, principalmente, atividade protetora sobre os danos induzidos por diferentes mutágenos, quando avaliado através dos testes de micronúcleos e cometa nos sistemas de pré-, co- e pós-tratamento (Scolastici et al., 2007, 2008a). Entretanto, alguns efeitos potencializadores foram encontrados, no teste cometa, quando este carotenóide foi administrado após a indução dos danos pelos agentes peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 4-nitroquinoleína-1-óxido (4-NQO) e metilmetanossulfonato (MMS) em células CHO (Scolastici et al., 2007).

### **1.5 Objetivos**

Os diversos resultados descritos na literatura referentes à atividade protetora do LIC, especialmente aqueles que envolvem sua capacidade de modular a toxicidade genética, ainda carecem de comprovação ou necessitam estudos adicionais para elucidar os mecanismos através dos quais este carotenóide exerce esta função. Adicionalmente, a falta de informações quanto ao possível efeito modulador do LIC sobre danos genéticos relacionados com recombinação mitótica justificaram o delineamento do presente estudo.

Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar a atividade bioantimutagênica do licopeno sobre os danos induzidos pelos agentes alquilantes mitomicina C (MMC) e etilmetanosulfonato (EMS) através do teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*, utilizando o protocolo de pós-tratamento.

- Quantificar os eventos genotóxicos induzidos nos diferentes tratamentos: recombinação mitótica versus mutação gênica e cromossômica, através da análise dos genótipos trans-heterozigotos para os marcadores genéticos (*mwh/flr<sup>3</sup>*) e heterozigotos para o cromossomo *TM3* (*mwh/TM3*).

## **CAPÍTULO II**

### **INVESTIGATION OF THE BIOANTIMUTAGENIC ACTIVITY OF LYCOPENE IN SOMATIC CELLS OF *Drosophila melanogaster***

Artigo a ser submetido à revista *Food and Chemical Toxicology*

ISSN: 0278-6915

**Investigation of the bioantimutagenic activity of lycopene in somatic cells of  
*Drosophila melanogaster***

M.P.M. Rigo, J.V. Alves; J.T.S.F. Lopes, H.H.R. de Andrade, M.L. Reguly and M.  
Lehmann\*

<sup>a</sup>Laboratório da Toxicidade Genética (TOXIGEN), Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada (PPGGTA), Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Prédio 22, 4<sup>o</sup> andar, Avenida Farroupilha, 8001, CEP 92425-900, Canoas, RS, Brazil.

Keywords: lycopene, SMART, antimutagenicity, *Drosophila melanogaster*, somatic cells.

*Abbreviations:* 4-NQO, 4-nitroquinoline-1-oxide; CHO, Chinese hamster ovary cells; DEN, n-nitrosodiethylamine; EMS, ethylmethanesulfonate; HepG2, human hepatoma cell line; HR, homologous recombination; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; LOH, loss of heterozygosity; LYC, lycopene; MMC, mitomycin C.

\*Corresponding author. Tel./Fax: + 55 51 34779214.

*E-mail address:* mauriciol@ulbra.br (M. Lehmann).

## ABSTRACT

The modulating effects of lycopene (LYC) on somatic mutation and mitotic recombination induced by ethylmethanesulfonate (EMS) and mitomycin C (MMC) were evaluated in the standard cross of the wing spot test in *Drosophila melanogaster* using the post-treatment protocol. It was shown that LYC alone did not modify the spontaneous spot frequencies, which means that this carotenoid neither acts as a genotoxin nor exerts any antigenotoxic effect over spontaneous DNA lesions. The data from LYC post-treatments demonstrated that this agent is not effective in exerting protective or enhancing effects on the genotoxicity of EMS or MMC. Moreover, these results indicate that LYC does not interfere with the proportion of recombinagenic/mutagenic genotoxic lesions and does not seem capable of modulating the *Drosophila* DNA repair processes involved in the correction of EMS and MMC-induced lesions.

## 1. Introduction

Strategies for cancer prevention are aimed at identifying and removing the risk factors in association with approaches that render the organism more resistant to mutagens/carcinogens and/or that inhibit progression of the disease by administering chemopreventive agents. The consumption of dietary components that could decrease the rate of DNA damage accumulation may be an effective strategy for either the modulation or the inhibition of the carcinogenic process. In this case, it is essential not only to assess safety and efficacy of candidate chemopreventive agents in preclinical models and in humans but also to understand their mechanisms of action (Ferguson et al., 2004; De Flora e Ferguson, 2005).

In this context, much attention has been given to lycopene (LYC), a bioactive carotenoid present in many fruits and vegetables including tomatoes, watermelons, pink grapefruits, apricots and pink guavas. Of the more than 50 dietary carotenoids, LYC is the most prevalent in diets in Western societies and the most abundantly detected in human serum. The antioxidant activity of LYC has gained attention in the last years, being considered one of the most potent antioxidants, with a capacity of quenching the singlet oxygen molecules twice as high as that of  $\beta$ -carotene and 10 times higher than that of  $\alpha$ -tocopherol (Singh and Goyal, 2008). In addition to its antioxidant properties, LYC shows an array of biological effects that include cardioprotective, anti-inflammatory, antimutagenic and anticarcinogenic activities (Rao and Agarwal, 2000; Bhuvaneshwari and Nagini, 2005; Rao et al., 2006; Rao and Rao, 2007; Khan et al., 2008).

LYC has become the object of this increased interest since epidemiological studies found out that consumption of tomato products reduced the risk of

developing cancer in different tissues (Bhuvaneshwari and Nagini, 2005). However, because of the massive amount of data regarding LYC anticarcinogenic studies, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) review the scientific data for tomato and/or LYC intake with respect to risk reduction for certain forms of cancer and found very limited evidence to support an association between tomato consumption and reduced risks of prostate, ovarian, gastric, and pancreatic cancers (Kavanaugh et al., 2007).

In spite of the fact that several experimental studies pointed out the protective activity of LYC against different mutagens, these studies are focused strictly on the investigation of gene and chromosome mutation (Velmurugan et al., 2004, 2005; Sendao et al., 2006; Scolastici et al., 2007, 2008a). No studies have yet been designed to investigate the LYC modulatory activity over homologous recombination (HR), a mechanism involved in the loss of heterozygosity (LOH). Since LOH is involved in the loss of tumour-suppressor genes and because it is considered an important oncogenetic mechanism (Bishop and Schiestl, 2001, 2003), the possible LYC modulatory activity on HR must be investigated in an attempt to better understand the mechanisms and conditions underlying its chemopreventive activity.

Using the SMART *Drosophila* wing-spot bioassay, the present study was designed to evaluate the bioantimutagenic activity of LYC on the DNA damage induced by ethylmethanesulphonate (EMS) and mitomycin C (MMC), two known mutagenic compounds amply used as positive controls in antimutagenic studies (Santos et al., 1999; Lehmann et al., 2000; Sinigaglia et al., 2004, 2006). This bioassay allows the simultaneous detection and quantification of mitotic recombination versus gene and chromosomal mutations (Andrade et al., 2004).

## 2. Materials and methods

### 2.1 Chemicals

Lycopene (LYC, Lyc-O-Mato<sup>®</sup>, natural tomato oleoresin containing 6% lycopene as determined by high-performance liquid chromatography) was kindly provided by LycoRed Natural Products Industries Ltd, Beer Sheva, Israel. For experimental purpose LYC was dissolved in 5% Tween-80 immediately before use and administered at two concentrations (0.06% and 0.12%).

The mutagens ethylmethanesulphonate (EMS, 62-50-0; Sigma, USA) and mitomycin C (MMC, 50-07-5; Bristol-Myers Squibb, Brazil) were dissolved in distilled water just before treatment. The doses of mutagens and LYC were established in previous pilot studies conducted in our laboratory in order to evaluate antimutagenicity of LYC with accuracy.

### 2.2 Somatic mutation and recombination test (SMART)

The standard (ST) cross of flies for the wing spot test was used following the methods described in Graf et al. (1984): virgin females of the strain *flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, ri p<sup>o</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>* were crossed with *mwh/mwh* males. Information on the genetic markers is given by Lindsley and Zimm (1992).

Eggs were collected for 8 hr in culture bottles containing a solid agar base (5% w/v agar agar in water) covered with a 5-mm layer of live baker's yeast supplemented with sucrose. After 3 days, the larvae were washed out of these bottles with tap water through a fine-meshed stainless steel strainer and then used for the treatments.

### 2.3 *Lycopene post-treatment*

The 3-day-old larvae were initially distributed into plexiglass tubes, which had the lower end covered with fine nylon gauze. These tubes were then placed into 50-ml beakers containing 0.3 g of powdered cellulose (Merck; Darmstadt, Germany) and 2 mL of distilled water or mutagen solution. The larvae were fed through the gauze on water or one concentration of the mutagen-cellulose suspension for 3 hr (EMS, 46 mM) or 6 hr (MMC, 0.12 mM). The two groups — submitted to acute feeding with water or genotoxins — were then washed and transferred to several vials containing 1.5 g of *Drosophila* Instant Medium (Formula 4-24, Carolina Biological Supply, Burlington, NC) containing either solvent alone (5% Tween-80) or one of the two LYC solutions (0.06 or 0.12%). The larvae were allowed to feed on the instant medium until pupation,  $\pm 48$  h.

All the experiments were carried out at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  and 60–70% relative humidity.

### 2.4 *Scoring of wings*

The adult flies were collected on days 10 to 12 after the treatments and stored in 70% ethanol. The ST cross produced two types of progeny that were distinguished phenotypically based on the  $Bd^S$  marker: trans-heterozygous flies ( $mwh/flr^3$ ) for the recessive wing-cell markers multiple wing hair ( $mwh$ ) and flare ( $flr^3$ ), and heterozygous flies ( $mwh/TM3$ ) for a balancer chromosome with large inversions on chromosome 3 ( $TM3$ ). Wings of five females and five males of the two genotypes were mounted on slides and scored at 400x magnification for the occurrence of spots. Induced LOH in the  $mwh/flr^3$  genotype leads to two types of mutant clones: single spots, either  $mwh$  or  $flr^3$ , which result from point mutation, chromosome

aberration, and/or mitotic recombination, and twin spots, consisting of both *mwh* and *flr<sup>3</sup>* subclones, which originate exclusively from mitotic recombination. In the *mwh/TM3* genotype, *mwh* spots reflect predominantly somatic point mutation and chromosome aberration, since mitotic recombination involving the balancer chromosome and its structurally normal homologue is a lethal event (Vogel et al., 1999). By comparing these two genotypes, it was possible to quantify the recombinagenic and mutagenic activities of each treatment (Andrade et al., 2004).

### 2.5 Statistical analysis

For the statistical assessment of data the multiple-decision procedure of Frei and Würzler (1988) was used, which makes it possible to obtain four different diagnoses: positive, weakly positive, negative or inconclusive. The frequencies of each type of mutant clones per fly of a treated series were compared pair-wise (i.e., control vs. LYC; control vs. genotoxin alone; genotoxin alone vs. genotoxin plus LYC) using the conditional binomial test according to Kastembaum and Bowman (1970). Because of the weak expression of the *flr<sup>3</sup>* marker in small clones and its lethality in large clones of mutant cells (Graf, 1995), only the *mwh* clones (*mwh* single and *mwh* twin spots) were used to calculate the clone formation frequencies per  $10^5$  cells. These values were then employed to estimate the contribution of recombination and mutation to the incidence of total mutant spots per fly in trans-heterozygous flies (Andrade et al., 2004).

### 3. Results

The analysis of *mwh/flr<sup>3</sup>* flies was used to assess the genetic toxicity of LYC alone (Table 1) while both *mwh/flr<sup>3</sup>* and *mwh/TM3* genotypes were investigated to appraise the effect of post-treatment with LYC on the genotoxicity of EMS and MMC (Table 2). The data obtained in two individual experiments with each genotoxin (EMS and MMC) were pooled, since no statistical differences were found.

#### 3.1 Lycopene treatment and positive controls

The data given in Table 1 represent the sum of four individual experiments (two with each genotoxin) and demonstrate that LYC alone (0.06 and 0.12%) did not modify the total spots scored when compared to their respective negative control (5% Tween-80).

EMS and MMC were genotoxic and produced significant increases in all spot categories in both genotypes when compared to their respective negative controls, although the frequency of spots induced in *mwh/TM3* flies was smaller than those obtained in *mwh/flr<sup>3</sup>* genotype (Table 2). These results are consistent with previously reported responses for these compounds in the SMART assay, confirming mitotic recombination as the prevalent genotoxic event induced by both genotoxins (Fig. 1) (Santos et al., 1999; Sinigaglia et al., 2004).

#### 3.2 Lycopene Post-treatments

As can be seen from the data on Table 2, LYC was not capable of modulating the genotoxic effect of EMS on both genotypes, although weak positive reductions were observed for large single spots at LYC 0.06% concentration and for small single spots at LYC 0.12% in *mwh/flr<sup>3</sup>* flies. Similarly, post-treatments with LYC did

not modify the frequency of total spots induced by MMC in trans- and balancer-heterozygous flies, although a weak positive decrease in the frequencies of twin spots with 0.06% LYC post-treatment and a positive increase on the incidence of small single spots at LYC 0.12% were observed in *mwh/flr<sup>3</sup>* genotype.

**Table 1**

*Drosophila* wing spot test (SMART) results in marker-heterozygous (*mwh/flr<sup>3</sup>*) progeny of the standard cross (ST) after the acute exposure of larvae with solvent control followed by chronic treatment with lycopen (LYC).

Treatments LYC (%)	No. of flies (N)	Spots per fly (no. of spots) statistical diagnosis <sup>a</sup>				Spots with <i>mwh</i> clone <sup>c</sup>
		Small single spots <sup>b</sup> (1–2 cells) <i>m</i> = 2	Large single spots <sup>b</sup> (>2 cells) <i>m</i> = 5	Twin spots <i>m</i> = 5	Total spots <sup>b</sup> <i>m</i> = 2	
0	80	0.26 (21)	0.05 (04)	0.00 (00)	0.31 (25)	25
0.06	80	0.26 (21) -	0.09 (07) i	0.01 (01) i	0.36 (29) -	28
0.12	80	0.16 (13) -	0.04 (03) i	0.01 (01) i	0.21 (17) -	17

<sup>a</sup>Statistical diagnoses according to Frei and Würzler (1988): –, negative, i, inconclusive. *P* ≤ 0.05. <sup>b</sup>Including rare *flr<sup>3</sup>* single spots. <sup>c</sup>Considering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots. <sup>d</sup>Calculated according to Frei et al. (1992).

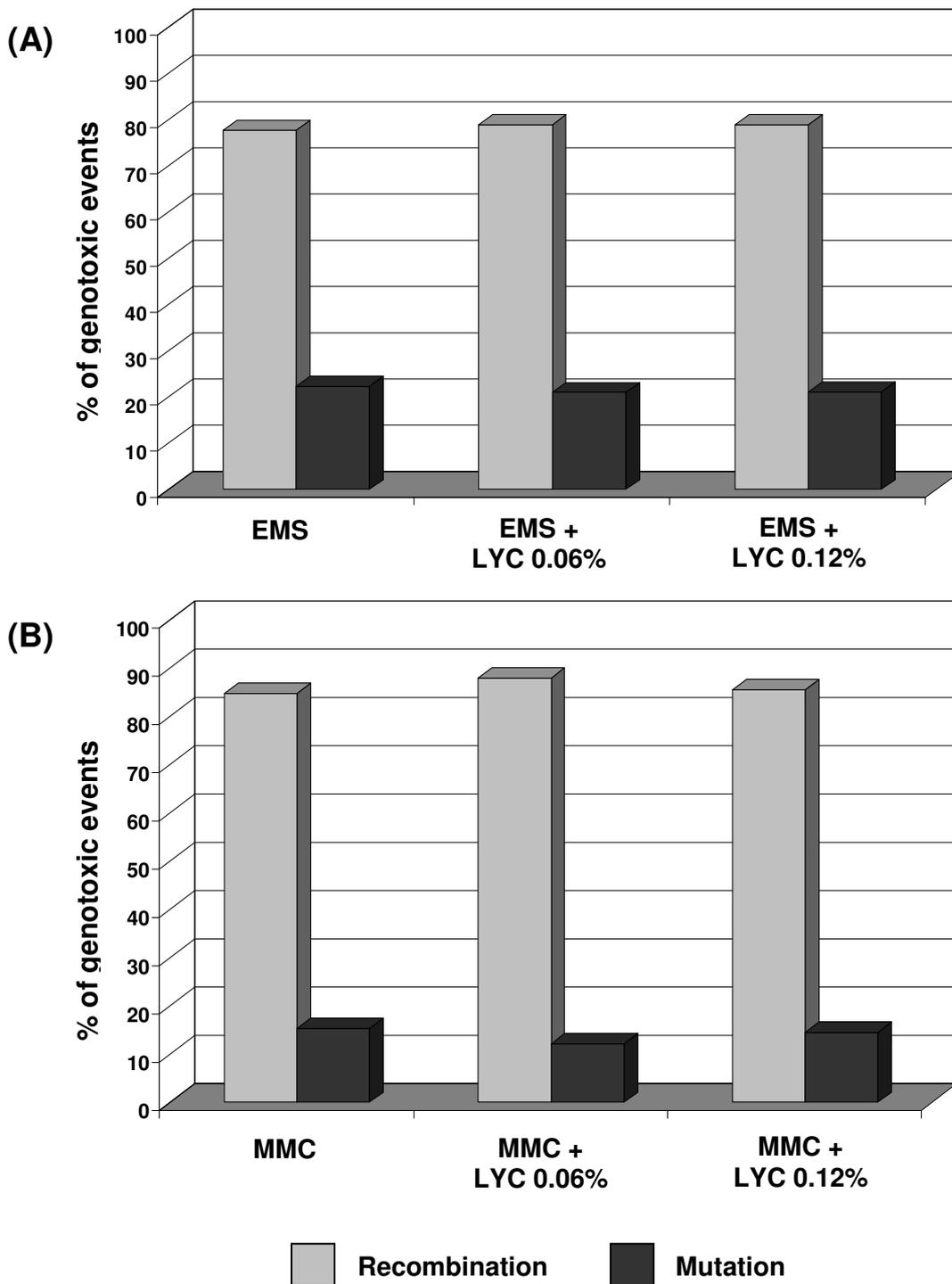
Figure 1 shows the proportion of mitotic recombination versus somatic mutation calculated based on the clone induction frequencies per 10<sup>5</sup> cells per cell division obtained for the two genotypes. For both genotoxins mitotic recombination was the prevalent mechanism involved in the induced mutant clones. Additionally, it was observed that LYC post-treatments were not able to modify the proportion observed for EMS and MMC treatments.

**Table 2**

*Drosophila* wing spot test (SMART) results in marker-heterozygous (*mwh/flr<sup>3</sup>*) and balancer-heterozygous (*mwh/TM3*) progeny of the standard cross (ST) after the acute exposure of larvae with EMS (3 h) or MMC (6 h) followed by chronic treatment with Lycopene (LYC).

Genotypes and treatments		No. of flies (N)	Spots per fly (no. of spots) statistical diagnosis <sup>a</sup>				Spots with <i>mwh</i> clone <sup>c</sup> (n)	Clone induction frequencies (per 10 <sup>5</sup> cells per cell division) <sup>d</sup> (n/NC) <sup>e</sup>	
LYC (%)	Mut (mM)		Small single spots <sup>b</sup> (1–2 cells) <i>m</i> = 2	Large single spots <sup>b</sup> (>2 cells) <i>m</i> = 5	Twin spots <i>m</i> = 5	Total spots <sup>b</sup> <i>m</i> = 2		Observed	Control corrected <sup>f</sup>
<b>EMS</b>									
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>									
0	0	40	0.33 (13)	0.05 (02)	0.00 (00)	0.38 (15)	15	0.77	
0	46	80	1.59 (127) *	2.63 (210) *	1.31 (105) *	5.53 (442) *	359	9.20	8.43
0.06	46	80	1.30 (104) -	2.06 (165) w+	1.61 (129) -	4.98 (398) -	338	8.66	7.89
0.12	46	80	1.10 (88) w+	2.69 (215) -	1.31 (105) -	5.10 (408) -	341	8.74	7.97
<i>mwh/TM3</i>									
0	0	40	0.20 (08)	0.03 (01)	<sup>g</sup>	0.23 (09)	09	0.46	
0	46	40	0.53 (21) *	0.48 (19) *		1.00 (40) *	40	2.05	1.59
0.06	46	35	0.54 (19) -	0.34 (12) i		0.89 (31) -	31	1.82	1.35
0.12	46	40	0.60 (24) -	0.30 (12) i		0.90 (36) -	36	1.84	1.38
<b>MMC</b>									
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>									
0	0	40	0.20 (08)	0.05 (02)	0.00 (00)	0.25 (10)	10	0.51	
0	0.12	60	0.67 (40) *	5.85 (351) *	1.80 (108) *	8.32 (499) *	465	15.88	15.37
0.06	0.12	60	0.73 (44) -	5.48 (329) -	1.38 (83) w+	7.60 (456) -	427	14.58	14.07
0.12	0.12	60	1.10 (66) +	5.78 (347) -	1.82 (109) -	8.70 (522) -	486	16.60	16.09
<i>mwh/TM3</i>									
0	0	40	0.15 (06)	0.13 (05)	<sup>g</sup>	0.28 (11)	11	0.56	
0	0.12	50	0.52 (26) *	0.66 (33) *		1.18 (59) *	59	2.42	1.86
0.06	0.12	50	0.34 (17) i	0.52 (26) i		0.86 (43) -	43	1.76	1.20
0.12	0.12	46	0.50 (23) -	0.67 (31) -		1.17 (54) -	54	2.41	1.84

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr<sup>3</sup>*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated. <sup>a</sup>Statistical diagnoses according to Frei and Würzler (1988): \*, positive;  $P \leq 0.05$  vs. untreated control. +, positive; w+, weakly positive; -, negative; i, inconclusive.  $P \leq 0.05$  vs. EMS or MMC alone. <sup>b</sup>Including rare *flr<sup>3</sup>* single spots. <sup>c</sup>Considering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots. <sup>d</sup>Calculated according to Frei et al. (1992). <sup>e</sup> $C = 48,800$  (approximate number of cells examined per fly). <sup>f</sup>Induction frequencies corrected for spontaneous incidence estimated from the negative controls. <sup>g</sup>Only *mwh* single spots can be observed in *mwh/TM3* heterozygotes as the balancer chromosome *TM3* does not carry the *flr<sup>3</sup>* mutation.



**Fig. 1.** Contribution of recombination and mutation to the incidence of total mutant spots per fly in trans-heterozygous flies submitted to acute **(A)** EMS or **(B)** MMC exposure alone and followed by LYC post-treatment. Percentage of recombination (R) and mutation (M) were calculated according to Frei and Würzler (1996):  $R = 1 - [(n/NC \text{ in } mwh/TM3 \text{ flies}) / (n/NC \text{ in } mwh/flr^3 \text{ flies})] * 100$ ;  $M = 100 - R$ .

#### 4. Discussion

In the present study, it was investigated the chemopreventive activity of LYC on DNA damage induced by EMS (alkylating agent) and MMC (alkylating and bifunctional DNA cross-linking agent) in the *Drosophila* wing SMART assay, using the post-treatment protocol. Marker-heterozygous (*mwh/flr<sup>3</sup>*) and balancer-heterozygous (*mwh/TM3*) genotypes were analyzed, which allowed to quantify the contribution of recombination and mutation to the induced mutant spots. The negative results observed with LYC alone are in line with previous studies that also found no mutagenic activity of LYC either in pro- or eukaryotic bioassays (McClain and Bausch, 2003; Sendao et al., 2006; Scolastici et al., 2007, 2008a).

According to the results found in the present study LYC does not modulate the mutagenic/recombinogenic activity of EMS and MMC when administered after the mutagens. Although many studies have described the antimutagenic/antigenotoxic activity of this carotenoid in different test systems *in vivo* and *in vitro* (Velmurugan et al., 2004, 2005; Sendao et al., 2006; Scolastici et al., 2007, 2008a,b), its modulatory effect has been observed in pre-treatment and co-administration protocols. Two reports, using the same source of LYC as the present investigation – in oleoresin formulation – observed that its chemopreventive activity was dependent on the concentrations and treatment schedules used. When administered prior to the mutagens hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), methylmethanesulphonate (MMS), 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) in Chinese hamster ovary cells (CHO) (Scolastici et al., 2007) and n-nitrosodiethylamine (DEN) and hydrogen peroxide in metabolically competent human hepatoma cell line (HepG2) (Scolastici et al., 2008a) a reduction was observed in micronucleated cells

depicted by micronucleus assay and in primary lesions detected using the comet assay. For simultaneous treatments LYC had the same protective effects with some exceptions and the post-treatments with LYC just decreased the micronucleated CHO cells induced by hydrogen peroxide (Scolastici et al., 2007) and DNA lesions detected in HepG2 cells in the comet assay (Scolastici et al., 2008a). On the contrary, this carotenoid was able to increase de primary DNA lesions induced by the mutagens on HepG2 cells (Scolastici et al., 2008a).

Although no protective action of lycopene was found in *mwh/flr<sup>3</sup>* genotype, *mwh/TM3* flies were analyzed in order to investigate a possible interference of this carotenoid on the proportion of mitotic recombination versus mutagenic lesions involved in the formation of wing spots. In this context, no differences were found after LYC administration, indicating that this carotenoid does not seem to interfere with the repair mechanisms involved in the correction of EMS and MMC DNA lesions. In fact, few studies have been conducted to evaluating the possible LYC interference on DNA repair mechanisms, which focused on the modulation of oxidative-damage repair in human lymphocytes treated with hydrogen peroxide using the comet assay. These studies suggest that the carotenoids, including LYC, are capable of exerting two overlapping but distinct effects: antioxidant protection by scavenging DNA-damaging free radicals, and modulation of DNA repair mechanisms (Astley and Elliott, 2005, Astley et al., 2003, 2004a,b).

Briefly, the data presented in this study show that LYC was not able to increase nor reduce the mutagenic activity of EMS and MMC, when applied after the induction of DNA damages, at the same time that it does not interfere with the type of lesions induced by both genotoxins. When these results are associated with

literature data, LYC appears to exert its antimutagenic activity mainly when applied prior to (pre-treatment) or in combination with (co-treatment) genotoxins. The post-treatment effect was observed mainly associated with hydrogen peroxide oxidative DNA damage (Velmurugan et al., 2004, 2005; Sendao et al., 2006; Scolastici et al., 2007, 2008a,b), reinforcing the fact that the LYC activity over DNA repair mechanisms could be associated only with this type of lesion. Further studies with the *Drosophila* SMART assay and other bioassays should be performed to better understand the mechanisms and conditions underlying its chemopreventive activity.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). The authors are indebted to Dr. Zohar Nir (LycoRed Natural Products Industries, Ltd., Beer-Sheeva, Israel) and Ayalla Marketing e Representações Ltda. (São Paulo, SP, Brazil) for the donation of lycopene.

### **References**

- Andrade, H.H.R., Reguly, M.L., Lehmann, M., 2004. Wing somatic mutation and recombination test (SMART). In: Henderson, D.S. (Ed.), *Drosophila* Cytogenetics Protocols. Humana Press Inc., Totowa, pp. 389-412.
- Astley, S.B., Elliott, R.M., 2005. How strong is the evidence that lycopene supplementation can modify biomarkers of oxidative damage and DNA repair in human lymphocytes? *J. Nutr.* 135, 2071S-2073S.

- Astley, S.B., Elliott, R.M., Archer, D.B., Southon, S., 2003. Increased cellular carotenoid levels reduce the persistence of DNA single-strand breaks following oxidative challenge. *Nutr. Cancer* 43, 202-213.
- Astley, S.B., Elliott, R.M., Archer, D.B., Southon, S., 2004a. Evidence that dietary supplementation with carotenoids and carotenoid-rich foods modulates the DNA damage: repair balance in human lymphocytes. *Br. J. Nutr.* 91, 63-72.
- Astley, S.B., Hughes, D.A., Wright, A.J.A., Elliott, R.M., Southon, S., 2004b. DNA damage and susceptibility to oxidative damage in lymphocytes: effects of carotenoids *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Nutr.* 91, 53-61.
- Bhuvanewari, V., Nagini, S., 2005. Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 5, 627-635.
- Bishop, A.J., Schiestl, R.H., 2001. Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1471, M109-M121.
- Bishop, A.J., Schiestl, R.H., 2003. Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Exp. Mol. Pathol.* 74, 94-105.
- De Flora, S., Ferguson, L.R., 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res.* 591, 8-15.
- Ferguson, L.R., Philpott, M., Karunasinghe, N., 2004. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology* 198, 147-159.
- Frei, H., Clements, J., Hove, D., Würgler, F.E., 1992. The genotoxicity of the anticancer drug mitoxantrone in somatic and germ-cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 279, 21-33.
- Frei, H., Würgler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203, 297-308.
- Frei, H., Würgler, F.E., 1996. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 11, 315-325.
- Graf, U., 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 51, 168-173.
- Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 271, 59-67.
- Kastembaum, M.A., Bowman, K.O., 1970. Tables to determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9, 527-549.

- Kavanaugh, C.J., Trumbo, P.R., Ellwood, K.C., 2007. The U.S. Food and Drug Administration's evidence-based review for qualified health claims: tomatoes, lycopene, and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 1074-1785.
- Khan, N., Afaq, F., Mukhtar, H., 2008. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 475-510.
- Lehmann, M., Graf, U., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 2000. Interference of tannic acid on the genotoxicity of mitomycin C, methylmethanesulfonate, and nitrogen mustard in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 36,195-200.
- Lindsley, D.L., Zimm, G.G., 1992. *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York. p. 1133.
- McClain, R.M., Bausch, J., 2003. Summary of safety studies conducted with synthetic lycopene. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 37, 274-285.
- Rao, A.V.R., Agarwal, S., 2000. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 563-569.
- Rao, A.V., Mira, M.R., Rao, L.G., 2006. Lycopene. *Adv. Food. Nutr. Res.* 51, 99-164.
- Rao, A.V., Rao, L.G., 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* 55, 207-216.
- Santos, J.H., Graf, U., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 1999. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 444, 355-365.
- Scolastici, C., de Lima, R.O.A., Barbisan, L.F., Ferreira, A.L., Ribeiro, D.A., Salvadori, D.M., 2007. Lycopene activity against chemically induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol. In Vitro* 21, 840-845.
- Scolastici, C., de Lima, R.O.A., Barbisan, L.F., Ferreira, A.L.A., Ribeiro, D.A., Salvadori, D.M., 2008a. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicol. In Vitro* 22, 510-514.
- Scolastici, C., Lopes, G.A.D., Barbisan, L.F., Salvadori, D.M.F., 2008b. Tomato oleoresin inhibits DNA damage but not diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis. *Exp. Toxicol. Pathol.* 60, 59-68.
- Sendao, M.C., Behling, E.B., dos Santos, R.A., Antunes, L.M.G., Bianchi, L.M.P., 2006. Comparative effects of acute and subacute lycopene administration on chromosomal aberrations induced by cisplatin in male rats. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1334-1339.

- Singh, P., Goyal, G.K., 2008. Dietary lycopene: its properties and anticarcinogenic effects. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 7, 255-270.
- Sinigaglia, M., Lehmann, M., Baumgardt, P., do Amaral, V.S., Dihl, R.R., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 2006. Vanillin as a modulator agent in SMART test: Inhibition in the steps that precede N-methyl-N-nitrosourea-, N-ethyl-N-nitrosourea-, ethylmethanesulphonate- and bleomycin-genotoxicity. *Mutat. Res.* 607, 225-230.
- Sinigaglia, M., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 2004. Effect of vanillin on toxicant-induced mutation and mitotic recombination in proliferating somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutag.* 44, 394-400.
- Velmurugan, B., Bhuvaneshwari, V., Abraham, S.K., Nagini, S., 2004. Protective effect of tomato against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced *in vivo* clastogenicity and oxidative stress. *Nutrition* 20, 812-816.
- Velmurugan, B., Mohan, K.V.P.C., Abraham, S.K., Nagini, S., 2005. Combination of S-allylcysteine and lycopene protects against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced genotoxicity and oxidative stress in mice. *Nutr. Res.* 25, 577-586.
- Vogel, W., Graf, U., Frei, H.-J. Nivard, M.M.J., 1999. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. In: McGregor, D.B., Rice, J.M., Venitt, S. (Eds.), *The Use of Short- and Medium-Term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation*, IARC Science Publication 146, pp. 427-470.

## **CAPÍTULO III**

### **3. Discussão Geral**

Embora não seja possível generalizar, devido à diversidade de condições envolvidas, está bem estabelecido que várias doenças crônicas podem apresentar mecanismos comuns que levam ao seu desenvolvimento, tais como danos ao DNA, estresse oxidativo e processos inflamatórios crônicos (De Flora et al., 1996). Além disso, estas doenças também podem apresentar os mesmos fatores de risco, sejam eles químicos, físicos ou biológicos e ainda ter em comum os mesmos fatores de proteção. Desta forma, estratégias de prevenção que sejam aplicáveis para o câncer, podem ser ao mesmo tempo benéficas para a prevenção de outras doenças crônicas (De Flora e Ferguson, 2005).

Entre as diferentes estratégias de prevenção primária do câncer e outras doenças originadas por danos ao material genético, está a implementação de medidas que tornem o organismo mais resistente à ação de compostos mutagênicos e carcinogênicos e que inibam a progressão da doença. Este tipo de intervenção é chamado de quimioprevenção e envolve a administração de agentes que possam bloquear a indução, inibir ou retardar a progressão do câncer. Podem ser utilizadas substâncias farmacológicas (Kelloff et al., 2004) ou componentes da dieta alimentar, (Surh, 2003; Ferguson et al., 2004) sob a forma de macro- e micronutrientes e substâncias fitoquímicas não-nutritivas. Seja qual for a estratégia a ser implementada, a quimioproteção requer não apenas uma avaliação segura e eficaz dos possíveis agentes quimiopreventivos em modelos animais e em

humanos, mas também um maior conhecimento dos seus mecanismos de ação (De Flora e Ferguson, 2005).

Neste sentido, o LIC vem sendo amplamente estudado em relação ao seu potencial tóxico, anticarcinogênico e antimutagênico/antigenotóxico em diferentes bioensaios *in vivo* e *in vitro*. Os resultados encontrados nestes trabalhos mostram que este composto não é tóxico, apresenta atividade moduladora em relação ao efeito mutagênico/carcinogênico de vários agentes químicos e que esta atividade depende do protocolo de administração, bem como da dose utilizada (McClain e Bausch, 2003; Atessahin et al., 2005, 2006; Velmurugan et al., 2005; Sendão et al., 2006; Burgess et al., 2008; Jian et al., 2008; Scolastici et al., 2007, 2008a,b; Singh e Goyal, 2008). Soma-se a isto uma vasta quantidade de estudos epidemiológicos que apresentam o LIC como um agente capaz de diminuir a incidência de câncer, especialmente tumores de próstata, de ovário, do sistema digestório e do pâncreas (Kavanaugh et al., 2007; Khan et al., 2008).

Entretanto, a ausência de informações a respeito da interferência do LIC sobre recombinação mitótica, determinou o delineamento do presente estudo. De fato, a recombinação homóloga (RH) vem sendo apontada como um dos mecanismos responsáveis pela perda de heterozigose de genes envolvidos na regulação do ciclo celular através da indução de conversão gênica, deleção de segmentos cromossômicos e translocações, sendo considerado como um dos principais processos de alterações genéticas envolvidos na gênese e progressão do câncer (Bishop e Schiestl, 2001, 2003). Com o objetivo de avaliar a possível atividade antimutagênica do LIC foi empregado, neste trabalho, o teste para detecção de mutação e recombinação em células somáticas de *D. melanogaster*,

uma ferramenta extremamente sensível para a análise da atividade mutagênica e antimutagênica de diversos compostos químicos (Graf et al., 1989; Vogel e Nivard, 1993; Vogel et al., 1999; Santos et al., 1999; Sinigaglia et al., 2004, 2006; Lehmann et al., 2000, 2003, 2004). Este bioensaio permite a avaliação de danos que envolvem mutação gênica, aberração cromossômica e recombinação mitótica, possibilitando a quantificação deste último evento para a genotoxicidade total dos compostos (Graf et al., 1984). A partir do cruzamento inicial de duas diferentes linhagens de *D. melanogaster*, foram obtidos dois genótipos distintos, designados como trans-heterozigotos para os marcadores recessivos *mwh* e *flr<sup>3</sup>* (*mwh/flr<sup>3</sup>*) e heterozigotos para o cromossomo *TM3* (*mwh/TM3*). Este último genótipo diferencia-se do trans-heterozigoto pela presença de um recorte na borda das asas. Já que o cromossomo *TM3* apresenta múltiplas inversões - que tornam inviáveis os produtos de recombinação - os imagos *mwh/TM3* expressam somente mutações gênicas e/ou cromossômicas, o que permitiu quantificar a real contribuição da recombinação, quando estes resultados foram comparados com aqueles obtidos para os indivíduos trans-heterozigotos (Graf et al., 1984). Os cálculos referentes à porcentagem de recombinação em relação aos demais eventos foram realizados de acordo com Frei et al. (1992), a partir da frequência de indução de clones por 10<sup>5</sup> células por divisão celular, utilizando apenas manchas simples *mwh* e manchas gêmeas, conforme a seguinte fórmula: [(frequência de indução de clones por 10<sup>5</sup> células por divisão celular observada nas moscas *mwh/TM3* / frequência de indução de clones por 10<sup>5</sup> células por divisão celular observada nas moscas *mwh/flr<sup>3</sup>*) - 1] x 100. A porcentagem de mutação gênica e cromossômica foi calculada subtraindo-se a % de recombinação de 100. A exclusão de manchas simples *flr<sup>3</sup>* destes cálculos ocorre

pelo fato do gene *flr<sup>3</sup>* não ser totalmente expresso fenotipicamente em manchas pequenas (1-2 células), dificultando sua correta identificação (Szabad et al., 1983).

Embora não existam dados na literatura que descrevam a frequência de danos induzidos pelo controle negativo com 5% Tween-80 no teste SMART, os valores encontrados no presente estudo estão de acordo com a variação apresentada na literatura com outros tipos de controles, como água destilada, 5% Tween-80 + 5% etanol, 1% Tween-80 + 3% etanol e DMSO (Frei e Würzler, 1996; Graf e Würzler, 1996; Rahden-Staron, 2002; Tiburi et al., 2002; Amaral et al., 2005). Da mesma forma, o EMS e a MMC quando administrados isoladamente apresentaram frequências de danos semelhantes a outros estudos, confirmando o alto índice de recombinação mitótica induzido por estes agentes alquilantes (Santos et al., 1999; Lehmann et al., 2000; Sinigaglia et al., 2004, 2006).

No que se refere aos resultados da atividade antimutagênica do LIC apresentados neste trabalho, verificou-se não haver efeito modulador deste carotenóide sobre as lesões induzidas pelos mutágenos EMS e MMC, através do protocolo de pós-tratamento. Soma-se a isto, o fato de que o LIC também não alterou a proporção dos tipos de eventos induzidos pelos agentes alquilantes. Ou seja, a quantidade de eventos recombinacionais variou de 78,98 a 77,72% para os dados relativos ao EMS e de 87,93 a 84,76% para a MMC, permanecendo elevada em relação à porcentagem de mutação gênica e cromossômica em todos os tratamentos realizados.

Resultados prévios descritos na literatura confirmam a ausência de atividade protetora do LIC - quando administrado no sistema de pós-tratamento - em relação

aos danos clastogênicos induzidos pelos mutágenos metilmetanossulfonato (MMS) e 4-nitroquinoleína-1-óxido (4-NQO) em células de ovário de hamster chinês (CHO) (Scolastici et al., 2007), assim como em relação aos danos induzidos pela n-nitrosodietilamina (DEN) em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) (Scolastici et al., 2008a), através do teste de micronúcleos (MN). Entretanto, nestes mesmos estudos verificou-se que o LIC foi capaz de reduzir os danos no DNA quando administrado previamente e simultaneamente ao MMS e à 4-NQO e quando fornecido antes do tratamento com o fármaco DEN. A única resposta protetora deste carotenóide em todos os protocolos utilizados (pré-, co- e pós-tratamento), em relação à indução de MN, ocorreu com a utilização do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) nas células CHO (Scolastici et al., 2007, 2008a). Nas células HepG2 o LIC reduziu os danos do  $H_2O_2$  apenas nos sistemas de pré- e co-tratamento (Scolastici et al., 2008a). Resultados semelhantes foram encontrados através do teste cometa, que permite a avaliação de genotoxicidade, uma vez que avalia danos genéticos primários, ou seja, que ainda podem ser corrigidos pelos sistemas de reparo. Entretanto, verificou-se que o LIC quando administrado antes dos compostos  $H_2O_2$ , 4-NQO e MMS aumentou a frequência de lesões no DNA em células CHO. Esta ação potencializadora do LIC foi atribuída a um possível efeito pró-oxidativo, ou seja, este carotenóide poderia estar gerando produtos oxidativos quando avaliado *in vitro* (Scolastici et al., 2007). Achados semelhantes já haviam sido descritos quando o LIC foi capaz de induzir danos oxidativos no DNA de células LNCaP de tumor prostático humano (Hwang e Bowen, 2005), além de potencializar o estresse oxidativo induzido por radiação UVA em células C3H de embriões de rato (Yeh et al., 2005).

Além de não ter apresentado efeito modulador sobre as lesões induzidas pelos dois mutágenos utilizados neste estudo, o LIC não interferiu na proporção entre danos recombinogênicos/mutacionais, sugerindo que este carotenóide não interfere nos mecanismos de reparo envolvidos na correção das lesões induzidas pelo EMS e MMC. Apesar de ambos serem considerados agentes alquilantes, são capazes de gerar diferentes lesões no material genético. Neste sentido, o EMS é considerado um alquilante monofuncional, capaz de doar grupos etil a sítios nucleofílicos reativos no DNA (Zhang et al., 2001), formando especificamente O<sup>6</sup>-etilguaninas, responsáveis por mutações do tipo transições A→T (Davies et al., 1995), corrigidas preferencialmente pelos mecanismos de reparo por excisão de bases e de nucleotídeos (Branda et al., 1999). Além de induzir mutações pontuais é também capaz de gerar trocas entre cromátides irmãs (Morales-Ramirez et al., 1995). Por outro lado, a MMC é um agente bifuncional, que forma monoadductos na posição N<sup>2</sup> da guanina e ligações cruzadas entre as cadeias de DNA, que podem ser reparadas através de diferentes mecanismos de reparo: síntese translesão, recombinacional e excisão de nucleotídeos (Lee et al., 2006).

Neste sentido, pouco se sabe a respeito da ação do LIC sobre os mecanismos de reparo do DNA. Alguns estudos sugerem que os carotenóides e alimentos ricos nestes elementos podem exercer efeitos protetores *in vivo* e *ex vivo*, sendo capazes de modular o reparo do DNA através de rotas bioquímicas sensíveis a mudanças no estado redox celular, que por sua vez influenciam os reparos por excisão de base e de nucleotídeos ou reparos associados à transcrição do DNA (Astley e Elliott, 2005). A maioria dos estudos relacionados com o LIC e demais carotenóides investigaram a possível modulação destes compostos sobre reparos

de DNA envolvidos com a correção de danos oxidativos através do teste cometa. Este bioensaio foi utilizado para medir a frequência de quebras simples no DNA *in vitro* em linfócitos-T MOLT-17 e *ex vivo* em linfócitos do sangue periférico humano, tratados ou não com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Astley et al., 2004b). Desta forma, as mudanças nos níveis basais de quebras simples no DNA e a resistência do DNA ao dano oxidativo causado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram avaliadas simultaneamente, antes e após a suplementação com diferentes carotenóides, incluindo o LIC. Os resultados obtidos mostraram que *in vitro* a absorção dos carotenóides pelas células foi dose-dependente. A concentração de beta-caroteno não resultou em mudanças nas taxas de quebras simples no DNA, mas a incubação das células com o LIC ou luteína acima de 2 µmol/l aumentou o número de danos nas células controle (sem tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). As células MOLT-17 foram menos suscetíveis aos danos oxidativos após a exposição a diferentes carotenóides em concentrações que variaram de 0,5 a 1 µmol/l, enquanto valores maiores que 1 µmol/l geraram efeitos ambíguos. A suplementação da dieta com carotenóides aumentou a concentração plasmática destes elementos em homens saudáveis que participaram voluntariamente do estudo. Como consequência, embora o LIC e a luteína não tenham alterado a frequência de quebras no DNA nos linfócitos controle, ou após o tratamento *ex vivo* com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi verificado um aumento no número de danos nas células não-tratadas de doadores que tiveram suplementação com o beta-caroteno, enquanto não houve alteração na resistência aos danos oxidativos (Astley et al., 2004b). Resultados semelhantes utilizando o mesmo bioensaio foram encontrados em células de adenocarcinoma de cólon humano HT-29 submetidas ao tratamento com LIC e beta-caroteno para verificar a possível proteção contra os danos

induzidos pela xantina e xantina oxidase. O LIC e o beta-caroteno foram capazes de reduzir os danos apenas nas concentrações mais baixas, enquanto em concentrações mais altas este efeito foi rapidamente perdido, gerando um aumento na concentração de lesões no DNA (Lowe et al., 1999). De uma maneira geral, estes resultados sugerem que os carotenóides são capazes de exercer dois efeitos distintos, que de certa forma podem ser sobrepostos: proteção antioxidante através do sequestro de espécies reativas de oxigênio (EROs) e modulação dos mecanismos de reparo do DNA (Lowe et al., 1999; Astley e Elliott, 2005; Astley et al., 2003, 2004a,b).

### **3.1 Conclusões**

Apesar de utilizarem diferentes formulações do LIC, todos os estudos realizados com este carotenóide permitem diagnosticá-lo como uma substância que apresenta efeitos benéficos relacionados com uma possível ação anticarcinogênica e com uma atividade antigenotóxica e antimutagênica, que dependem da dose e protocolo de administração. Os resultados apresentados no presente estudo mostram que *in vivo* o LIC não foi capaz de modular a atividade mutagênica e recombinogênica dos agentes alquilantes EMS e MMC, ao mesmo tempo em que não alterou a proporção dos tipos de eventos induzidos, quando administrado após a indução dos danos no DNA em células somáticas de *D. melanogaster*. A combinação destes dados com os previamente descritos na literatura permite concluir que o LIC parece exercer atividade antimutagênica principalmente quando aplicado nos sistemas de pré- e co-tratamentos. Os efeitos protetores exercidos por este carotenóide foram observados principalmente sobre danos oxidativos induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Velmurugan et al., 2005; Sendão et al., 2006; Scolastici et al., 2007,

2008a,b), aumentando as evidências de que o LIC exerce atividade antimutagênica através da sua ação antioxidante ou por interferir sobre os mecanismos de reparo envolvidos na correção deste tipo de lesão. Desta forma, são necessários estudos adicionais com o teste SMART, seja através da utilização de outros mutágenos ou da variação no protocolo de tratamento, com o objetivo de esclarecer os mecanismos e condições que envolvem a atividade quimiopreventiva do LIC.

## CAPÍTULO IV

### 4. Bibliografia Geral

AMARAL, V.S., DA SILVA, R.M., REGULY, M.L., DE ANDRADE, H.H. Drosophila wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. *Mutation Research*, v.2, p. 67-74, 2005.

AMOTZ, B.A., FISHLER, R. Analysis of carotenoids with emphasis on 9-cis  $\beta$ -carotene in vegetables and fruits commonly consumed in Israel. *Food Chemistry*, v. 62, p. 515- 520, 1998.

ASTLEY, S.B., ELLIOTT, R.M. How strong is the evidence that lycopene supplementation can modify biomarkers of oxidative damage and DNA repair in human lymphocytes? *Journal of Nutrition*, v. 135, p. 2071S-2073S, 2005.

ASTLEY, S.B., ELLIOTT, R.M., ARCHER, D.B., SOUTHON, S. Increased cellular carotenoid levels reduce the persistence of DNA single-strand breaks following oxidative challenge. *Nutrition and Cancer*, v. 43, p. 202-213, 2003.

ASTLEY, S.B., ELLIOTT, R.M., ARCHER, D.B., SOUTHON, S. Evidence that dietary supplementation with carotenoids and carotenoid-rich foods modulates the DNA damage: repair balance in human lymphocytes. *The British Journal of Nutrition*, v.91, p. 63-72, 2004a.

ASTLEY, S.B., HUGHES, D.A., WRIGHT, A.J.A., ELLIOTT, R.M., SOUTHON, S. DNA damage and susceptibility to oxidative damage in lymphocytes: effects of carotenoids *in vitro* and *in vivo*. *The British Journal of Nutrition*, v. 91, p. 53-61, 2004b.

ATESSAHIN, A., KARAHAN, I., TÜRK, G., GÜR, S., YILMAZ, S., CERIBASI, A.O. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reproductive Toxicology*, v. 21, p. 42-47, 2006.

ATESSAHIN, A., YILMAZ, S., KARAHAN, I., CERIBASI, A.O., KARAOGLU, A. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology*, v. 212, p. 116-123, 2005.

BISHOP, A.J., SCHIESTL, R.H. Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1471, p. M109-M121, 2001.

BISHOP, A.J., SCHIESTL, R.H. Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 74, p. 94-105, 2003.

BOHM, V., BITSCH, R. Intestinal absorption of lycopene from different matrices and interactions to other carotenoids, the lipid status, and the antioxidant capacity of human plasma. *European Journal of Nutrition*, v.38, p. 118-125, 1999.

BOILEAU, T.W., LIAO, Z.M., KIM, S., LEMESHOW, S., ERDMAN, J.W., CLINTON, S.K. Prostate carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed with tomato powder, lycopene, or energy-restricted diets. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 95, p.1578-1586, 2003.

BRANDA, R.F., LAFAYETTE, A.R., O'NEILL, J.P., NICKLAUS, J.A. The effect of folate deficiency on the *hprt* mutational spectrum in Chinese hamster ovary cells treated with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research*, v. 427, p. 79-87, 1999.

BURGESS, L.C., RICE, E., FISCHER, T., SEEKINS, J.R., BURGESS, T.P., STICKA, S.J., KLATT, K. Lycopene has limited effect on cell proliferation in only two of seven human cell lines (both cancerous and noncancerous) in an *in vitro* system with doses across the physiological range. *Toxicology in Vitro*, v. 22, p. 1297-1300, 2008.

BUZZINI, S.R.R., MATSUDO, V.K.R. Radicais livres, exercício e envelhecimento. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, v.4, p. 61-85, 1990.

CARVALHO, W., FONSECA, E.M., SILVA, H., BOITEUX, L., GIORDANO, L. Indirect estimation of lycopene concentration in fruits of tomato genotypes via chromaticity values. *Horticultura Brasileira*, v. 23, p. 819-825, 2005.

CERQUEIRA, F.M., DE MEDEIROS, M.H.G., OHARA, A. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, v. 30, p. 441-449, 2007.

CLINTON, S.K., EMENHISER, C., SCHWARTZ, S.J., BOSTWICK, D.G., WILLIAMS, A.W., ERDMAN, J.W.Jr. Cis-trans lycopene isomers, carotenoids and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiology*, v. 5, p. 823-833, 1996.

CRAMER, D.W., KUPER, H., HARLOW, B.L., TITUS-ERNSTOFF, L. Carotenoids, antioxidants and ovarian cancer risk in pre- and postmenopausal women. *International Journal of Cancer*, v. 94, p. 128-134, 2001.

DAVIES, M.J., PHILLIPS, B.J., RUMSBY, P.C. Molecular analysis of chemically-induced mutations in mammalian cell assays. *Toxicology in Vitro*, v. 9, p. 513-518, 1995.

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

DE FLORA, S., IZZOTTI, A., RANDEPATH, K., RANDEPATH, E., BARTSCH, H., NAIR, J., BALANSKY, R.M., VAN SCHOOTEN, F.J., DEGAN, P., FRONZA, G., WALSH, D., LEWTAS, J. DNA adducts in chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. *Mutation Research*, v. 366, p. 197-238, 1996.

DELANTY, N., DICHTER, M.A. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 98, p. 145-53, 1998.

EL-AGAMEY, A., LOWE, G.M., MCGARVEY, D.J., MORTENSEN, A., PHILIP, M., TRUSCOTT, T.G., YOUNG, A.J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 430, p. 37-48, 2004.

FERGUSON, L.R., PHILPOTT, M., KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, v. 198, p. 147-159, 2004.

FERREIRA, A.L.A., SALVADORI, D.M.F., NASCIMENTO, M.C.M.O., ROCHA, N.S., CORREA, C.R., JAMAS, E. PEREIRA, MATSUBARA, L.S., MATSUBARA, B.B., LADEIRA, M.S.P. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. *Mutation Research*, v. 631, p. 26-35, 2007.

FLORA, S.J. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)*, v. 53, p. 1-2, 2007.

FREI, H., WÜRGLER, F.E. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, v. 11, p. 315-325, 1996.

FREI, H., CLEMENTS, J., HOVE, D., WÜRGLER, F.E. The genotoxicity of the anticancer drug mitoxantrone in somatic and germ-cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, v. 279, p. 21-33, 1992.

GARTNER, C., STAHL, W., SIES, H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 66, p. 116-122, 1997.

GOULD, W.A. *Tomato Production, Processing & Technology*, 3<sup>rd</sup> ed., Baltimore: CTI Publications, 1992, 535 p.

GRAF, U., WÜRGLER, F.E. The somatic white-ivory eye spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Molecular Mutagenesis*, v. 27, p. 219-26, 1996.

GRAF, U., FREI, H., KÄGI, A., KATZ, A.J., WÜRGLER, F.E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, v. 222, p. 359-373, 1989.

GRAF, U., WÜRGLER, F.E., KATZ, A.J., FREI, H., JUON, H., HALL, C.B., KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 6, p. 153-188, 1984.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5<sup>th</sup> ed., Oxford: Clarendon Press, 1999, 936 p.

HALLIWELL, B., WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damages *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, v. 142, p. 231-255, 2004.

HEBER, D., LU, Q.Y. Overview of mechanisms of action of lycopene. *Experimental Biology and Medicine*, v. 227, p. 920-923, 2002.

HWANG, E.S., BOWEN, P.E. Effects of lycopene and tomato paste extracts on DNA and lipid oxidation in LNCaP human prostate cancer cells. *Biofactors*, v. 23, p. 97-105, 2005.

JIAN, W.C., CHIOU, M.H., CHEN, Y.T., LIN, C.N., WU, M.C., DU, C.J., CHEN-PAN, C. Twenty-eight-day oral toxicity study of lycopene from recombinant *Escherichia coli* in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 52, p. 163-168, 2008.

KAVANAUGH, C.J., TRUMBO, P.R., ELLWOOD, K.C. The U.S. Food and Drug Administration's evidence-based review for qualified health claims: tomatoes, lycopene, and cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 99, p. 1074-1085, 2007.

KELLOFF, G.J., HAWK, E.T., SIGMAN, C.C. *Cancer chemoprevention: promising cancer chemopreventive agents*, vol. 1. Totowa: Humana Press, 2004, 697 p.

KHACHIK, F., CARVALHO, L., BERNSTEIN, P.S., MUIR, G.J., ZHAO, D.Y., KATZ, N.B. Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Experimental Biology and Medicine*, v. 227, p. 845-51, 2002.

KHAN, N., AFAQ, F., MUKHTAR, H. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 10, p. 475-510, 2008.

KIRSH, V., MAYNE, S., PETERS, U., CHATERJEE, N., LEITZMANN, M., DIXON, L., URBAN, D., CRAWFORD, E., HAYES, R. A prospective study of lycopene and tomato product intake and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, v. 15, p. 92-98, 2006.

LEE, Y.J., PARK, S.J., CICCONE, S.L., KIM, C.R., LEE, S.H. An *in vivo* analysis of MMC-induced DNA damage and its repair. *Carcinogenesis*, v. 27, p.446-53, 2006.

LEHMANN, M., FRANCO, A., VILAR, K.S.P., REGULY, M.L., ANDRADE, H.H.R. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, v. 539, p. 167-175, 2003.

LEHMANN, M., GRAF, U., REGULY, M.L., ANDRADE, H.H.R. Interference of tannic acid on the genotoxicity of mitomycin C, methylmethanesulfonate, and nitrogen mustard in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 36, p. 195-200, 2000.

LEHMANN, M., VILAR, K.S.P., FRANCO, A., REGULY, M.L., ANDRADE, H.H.R. Activity of topoisomerase inhibitors daunorubicin, idarubicin and aclarubicin in the *Drosophila* somatic mutation and recombination test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 43, p. 250-257, 2004.

LEVY, J., SHARONI, Y. The functions of lycopene in tomatoes and their role in human health. *American Botanical Council*, v. 62, p. 49-56, 2004.

LOWE, G.M., BOOTH, L.A., YOUNG, A.J., BILTON, R. F. Lycopene and beta-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. *Free Radical Research*, v. 30, p. 141-151, 1999.

MATÉS, J.M., PÉREZ-GÓMEZ, C., NÚÑES DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, v. 32, p. 595-603, 1999.

MAXWELL, S., GREIG, L. Anti-oxidants - a protective role in cardiovascular disease? *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 2, p. 1737-1750, 2001.

McCLAIN, R.M., BAUSCH, J. Summary of safety studies conducted with synthetic lycopene. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 37, p. 274-285, 2003.

MENDEZ FILHO, J. D., RODRIGUEZ, H. G. R. Sobre los beneficios de los radicales libres. *Rev Med IMSS*, v. 35, p. 309-313, 1997.

MICHAUD, D.S., FESKANICH, D., RINN, E.B., COLDITZ, G.A., SPEIZER, F.E., WILLETT, W.C., GIOVANNUCCI, E. Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 72, p. 990-997, 2000.

MORALES-RAMIREZ, P., RODRIGUEZ-REYES, R., VALLARINO-KELLY, T. Fate of lesions that elicit sister chromatid exchanges (FLE-SCE) produced in DNA by alkylating agents *in vivo*. *Mutation Research*, v. 344, p. 13-26, 1995.

MORITZ, B., TRAMONTE, V.L.C. Biodisponibilidade do licopeno. *Revista de Nutrição*, v. 19, p. 265-273, 2006.

MURE, K., ROSSMAN, T.G. Reduction of spontaneous mutagenesis in mismatch repair-deficient and proficient cells by dietary antioxidants. *Mutation Research*, v. 480-481, p. 85-95, 2001.

NGUYEN, M.L., SCHWARTZ, S.J. Lycopene: chemical and biological properties. *Food Technology*, v.53, p.38-45, 1999.

RAHDEN-STARON, I. The inhibitory effect of the fungicides captan and captafol on eukaryotic topoisomerases *in vitro* and lack of recombinagenic activity in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, v. 518, p. 205-213, 2002.

RAO, A.V. Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. *Experimental Biology and Medicine*, v. 227, p. 908-913, 2002.

RAO, A.V., AGARWAL, S. Bioavailability and *in vivo* antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer. *Nutrition and Cancer*, v. 31, p. 199-203, 1998.

RAO, A.V., AGARWAL, S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 19, p. 563-569, 2000.

RAO, A.V., RAO, L.G. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, v. 55, p. 207-216, 2007.

REYNOLDS, A., LAURIE, C., LEE MOSLEY, R., GENDELMAN, H.E. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *International Review of Neurobiology*, v. 82, p. 297-325, 2007.

SANTOS, J.H., GRAF, U., REGULY, M.L., ANDRADE, H.H.R. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, v. 444, 355–365, 1999.

SCOLASTICI, C., DE LIMA, R.O.A., BARBISAN, L.F., FERREIRA, A.L., RIBEIRO, D.A., SALVADORI, D.M. Lycopene activity against chemically induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Toxicology in Vitro*, v. 21, p. 840-845, 2007.

SCOLASTICI, C., DE LIMA, R.O.A; BARBISAN, L.F., FERREIRA, A.L.A., RIBEIRO, D.A., SALVADORI, D.M. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicology in Vitro*, v. 22, p. 510-514, 2008a.

SCOLASTICI, C., LOPES, G.A.D., BARBISAN, L.F., SALVADORI, D.M.F. Tomato oleoresin inhibits DNA damage but not diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 60, p. 59-68, 2008b.

SENDÃO, M.C., BEHLING, E.B., DOS SANTOS, R.A., ANTUNES, L.M.G., BIANCHI, L.M.P. Comparative effects of acute and subacute lycopene administration on chromosomal aberrations induced by cisplatin in male rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, p. 1334-1339, 2006.

SHAMI, N.J.J.E, MOREIRA, M.A.E. Lycopene as an antioxidant agent. *Revista de Nutrição*, v. 17, p. 227-236, 2004.

SINGH, P., GOYAL, G.K. Dietary lycopene: its properties and anticarcinogenic effects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 7, p. 255-270, 2008.

SINIGAGLIA, M., LEHMANN, M., BAUMGARDT, P., DO AMARAL, V.S., DIHL, R.R., REGULY, M.L., ANDRADE, H.H.R. Vanillin as a modulator agent in SMART test: Inhibition in the steps that precede N-methyl-N-nitrosourea-, N-ethyl-N-nitrosourea-, ethylmethanesulphonate- and bleomycin-genotoxicity. *Mutation Research*, v. 607, p. 225-230, 2006.

SINIGAGLIA, M., REGULY, M.L., ANDRADE, H.H.R. Effect of vanillin on toxicant-induced mutation and mitotic recombination in proliferating somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 44, p. 394-400, 2004.

SRINIVASAN, M., SUDHEER, A.R., PILLAI, K.R., KUMAR, P.R., SUDHAKARAN, P.R., MENON, V.P. Lycopene as a natural protector against  $\gamma$ -radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1770, p. 659-665, 2007.

SURH, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, p. 768-780, 2003.

SZABAD, J., SOÓS, I., POLGÁR, G., HÉJJA, G. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. *Mutation Research*, v. 113, p. 117-133, 1983.

TANG, L., GUAN, H., DING, X., WANG, J. Modulation of aflatoxin toxicity and biomarkers by lycopene in F344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 219, p. 10-17, 2007.

TIBURI, M., REGULY, M.L., SCHWARTSMANN, G., CUNHA, K.S., LEHMANN, M., ANDRADE, H.H.R. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, v. 26, p. 141-149, 2002.

TÜRK, G., ATESSAHIN, A., SÖNMEZ, M., YÜCE, A., OSMAN, A., ÇERIBASSI, A.O. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. *Theriogenology*, v. 67, p. 778-785, 2007.

TYSSANDIER, V., FEILLET-COUDRAY, C., CARIS-VEYRAT, C., GUILLAND, J., COUDRAY, C., BUREAU, S., REICH, M., AMIOT-CARLIN, M., DEMANGE, C., BOIRIE, Y., BOREL, P. Effect of tomato product consumption on the plasma status of antioxidant microconstituents and on the plasma total antioxidant capacity in healthy subjects. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 23, p. 148-156, 2004.

UNLU, N.Z., BOHN, T., FRANCIS, D., CLINTON, S.K., SCHWARTZ, S.J. Carotenoid absorption in humans consuming tomato sauces obtained from tangerine or high-beta-carotene varieties of tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 1597-1603, 2007.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.D., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, p. 44-84, 2007.

VELMURUGAN, B., MOHAN, K.V.P.C., ABRAHAM, S.K., NAGINI, S. Combination of S-allylcysteine and lycopene protects against N-methyl-NV-nitro-N-nitrosoguanidine-induced genotoxicity and oxidative stress in mice. *Nutrition Research*, v. 25, p. 577-586, 2005.

VELMURUGAN, B., SANTHIYA, S.T., NAGINI, S. Protective effect of S-allylcysteine and lycopene in combination against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced genotoxicity. *Polish Journal of Pharmacology*, v. 56, p 241-245, 2004.

VOGEL, W., NIVARD, M.M.J. Performance of 181 chemicals in a Drosophila assay predominantly monitoring interchromosomal mitotic recombination. *Mutagenesis*, v. 8, p. 57-81, 1993.

VOGEL, W., GRAF, U., FREI, H.J., NIVARD, M.M.J. The results of assays in Drosophila as indicators of exposure to carcinogens. In: McGregor, D.B., Rice, J.M., Venitt, S. (Eds.). *The Use of Short- and Medium-Term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation*, Lyon: IARC Science Publication 146, pp. 427-470, 1999.

WARD, R.J., PETERS, T.J. Free Radicals. In: MARSHALL, W.J., BANGERT, S.K. (Eds). *Clinical Biochemistry: metabolic and clinical aspects*. New York: Churchill Livingstone, pp. 765-777, 1995.

WEISBURGER, J.H. Lycopene and tomato products in health promotion. *Experimental Biology and Medicine*, v. 227, p. 924-927, 2002.

WILLCOX, J.K., CATIGNANI, G.L., LAZARUS, S. Tomatoes and cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 43, p. 1-18, 2003.

WILLIS, M.S., WIANS, F.H.Jr., The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances. *Clinica Chimica Acta*, v. 330, p. 57-83, 2003.

YEH, S.L., HUANG, C.S., HU, M.L. Lycopene enhances UVA induced DNA damage and expression of heme oxygenase 1 in cultured mouse embryo Wbroblasts. *European Journal of Nutrition*, v. 44, p. 365-370, 2005.

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

ZHANG, J.G., NICHOLLS-GRZEMSKI, F.A., TIRMENSTEIN, M.A., FARISS, M.W. Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. *Chemico-Biological Interactions*, v. 138, p. 267-284, 2001.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)