

LETÍCIA MARIA BIGNOTTO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LICOPENO
NAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES FUNCIONAIS
INDUZIDAS PELA INIBIÇÃO CRÔNICA DA SÍNTESE DE
ÓXIDO NÍTRICO E EM MODELOS DE
INFLAMAÇÃO AGUDA**

CAMPINAS

Unicamp

2008

LETÍCIA MARIA BIGNOTTO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LICOPENO
NAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES FUNCIONAIS
INDUZIDAS PELA INIBIÇÃO CRÔNICA DA SÍNTESE DE
ÓXIDO NÍTRICO E EM MODELOS DE
INFLAMAÇÃO AGUDA**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Doutor em Farmacologia

Orientador: Professor Dr. Heitor Moreno Júnior

Co-orientador: Professor Dr. Helder Mota-Filipe

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B486a Bignotto, Letícia Maria
Avaliação dos efeitos do licopeno nas alterações cardiovasculares
funcionais induzidas pela inibição crônica da síntese de óxido nítrico e
em modelos de inflamação aguda / Letícia Maria Bignotto. Campinas,
SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: Heitor Moreno Júnior, Helder Mota-Felipe
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Licopeno. 2. Hipertensão. 3. Óxido nítrico. 4. Inflamação.
I. Moreno Júnior, Heitor. II. Mota-Felipe, Helder. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês: Evaluation the effects of lycopene in the cardiovascular alterations induced by chronic inhibition of nitric oxide and experimental acute inflammation model

Keywords: • Lycopene
• Hypertension
• Nitric oxide
• Inflammation

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

Prof. Dr. Edson Antunes

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Prof. Dr. Marcelo Muscará

Prof. Dr. Rui Manuel dos Santos Póvoa

Data da defesa: 12 - 11 - 2008



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

Membros:

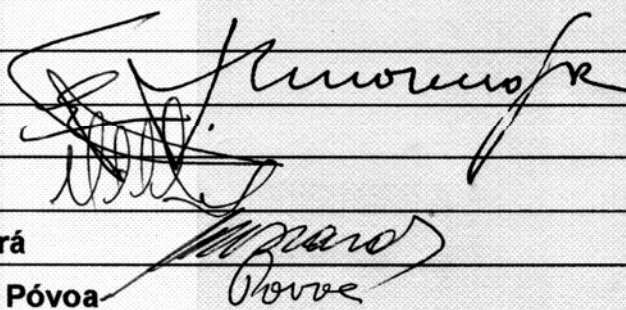
Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

Prof. Dr. Edson Antunes

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará

Prof. Dr. Rui Manuel dos Santos Póvoa

Handwritten signatures of the five members of the thesis examination board are written over the names. The signatures are in black ink and are quite stylized. The signature for Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior is the largest and most prominent, written over his name and extending into the space of the other names. The other signatures are smaller and more compact, written over the names of Prof. Dr. Edson Antunes, Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas, Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará, and Prof. Dr. Rui Manuel dos Santos Póvoa.

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 12/11/2008

Dedicatória

A Deus
que em qualquer lugar e em qualquer situação estiver na minha vida é
sempre Deus quem me reanima,
me dá força, é Ele a fonte de tudo!
"Tudo posso naquele que me fortalece"
Filipenses 4:13;

Aos meus pais,
cujos objetivos de vida são
realizar os sonhos dos filhos;

Aos meus irmãos
Silvana e Eduardo
que incondicionalmente estiveram presentes em
todos os momentos da minha vida e que
junto com meus pais completam a definição de família;

Ao meu cunhado
Maurício e cunhada Daniele
que são para mim como meus irmãos;

Aos meus sobrinhos
Mateus e Afonso
que basta um sorriso manifestado por eles,
para tornar insignificante qualquer obstáculo;

Aos meus mestres
Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud, Profa. Dra. Yoko Franco, Prof. Dr. Stephen Hyslop,
Prof. Dr. Helder Mota-Filipe, Prof. Dr. Bruno Sepodes, Prof. Dr. Edson Antunes cuja
influência sobre meu desenvolvimento excede o âmbito profissional.

A Deus pelo dom da vida, por cuidar de mim e me ajudar a seguir o caminho da verdade e da justiça. Esse Deus que é o meu amigo mais fiel onde sempre é o consolo nos momentos tristes, companheiro nos momentos felizes e a resposta nos momentos de dúvidas.

À minha família, meus pais, irmão e cunhados por estarem sempre ao meu lado nas minhas lamentações e alegrias, sempre me apoiando em todas as minhas escolhas.

Ao Professor Dr. Heitor Moreno Júnior responsável pela rica transmissão de conhecimentos e experiências e que sem sua presença em minha vida, nada do que eu realmente precisava saber seria aprendido.

Ao Professor Dr. Helder Mota-Filipe por simplesmente ser quem é, inteligente, alegre, e que possui uma admirável capacidade de ensinar e uma infinita bondade. Pessoa que quanto mais se conhece, mais se admira e por isso agradeço a oportunidade de ter conhecido uma pessoa como você.

Ao Professor Dr. Marco Vinícius Chaud que foi quem me ensinou o amor pela ciência. Com tantos anos de amizade, ainda é o exemplo de pesquisador e professor que sigo.

À Professora Dra Yoko Franco pelos ricos ensinamentos aliados a forte amizade, apoio e confiança que sempre demonstrou por mim.

À Professora Dra Maria Eduardo Figueira não só pelo auxílio técnico-científico, mas também por ser responsável por vários momentos felizes envolvidos nessa tese.

À Professora Dra Ondina Paganelli pela amizade e confiança que sempre demonstrou por mim.

Aos professores Prof. Dr. Edson Antunes e Prof. Dr. Stephen Hyslop pela importante contribuição, pela confiança e amizade demonstrados no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Professor Dr. João Ernesto de Carvalho que foi fundamental para o desenvolvimento dessa tese.

À Professora Dra. Sílvia Lacchini pela confiança, apoio e amizade.

Ao Professor Dr. Rui Pinto pelo apoio e amizade.

Aos amigos Bruno Sepodes, Christina Sant'Ana, Cláudia Fernandes, Cristina Okuyama, Fabio Coracin, João Rocha, Juliana Almeida, Luiz Gustavo, Maricene, Renata Oliveira, Raquel Lorenzetti por me ajudarem a entender o real significado da palavra "amigo". "Algumas amizades não duram nada, mas um verdadeiro amigo é mais chegado que um irmão" (Pv 18:24).

Aos amigos e colegas Danielle Cesconeto, Enilton Camargo, Francileuda, Gláucia, Jaqueline Rocha, Lourdes Dias, Luís Fernando Pozzi, Luciana Jankowsky, Patrícia Marques, Pedro Baracho, Rafael Sutti, Walneia, Tatiane e Nádia por todo apoio que me deram, pois vocês foram essenciais para o desenvolvimento dessa tese.

Ao Wanderlei por toda paciência e amizade demonstradas por mim em todo o percurso dessa tese.

Aos técnicos de laboratório Adilson e Joaquim que sempre demonstraram carinho e amizade por mim.

Ao Sr Miguel e Marcos por toda amizade por mim demonstrada e por todo cuidado que sempre tiveram com os animais de laboratório usados.

Aos companheiros de laboratório e ambulatório Ademir, Adriana, Daniele, Deise, Fabrício, Juan, Luís Cláudio, Lílian, Patrícia, Samira, Sílvia E. Melo, Rafael, Ricardo, Valéria pelo apoio.

A todos os funcionários do departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa pela amizade.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

“Provações te buscaram.
Dificuldades te agitaram.
Tudo parece noite ao redor de teus passos.
Não te detenhas, no entanto, a fim de medir as sombras.
Prossegue trabalhando.
E não te afastes da paciência.
Por nada te desesperes.
Dê tempo a Deus para que te acenda nova luz”

Emmanuel - Francisco Cândido Xavier

	Pág.
RESUMO.....	xxxix
ABSTRACT.....	xxxv
1- INTRODUÇÃO.....	39
2- OBJETIVOS.....	51
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1- Protocolo 1- Modelo de inibição crônica da síntese de óxido nítrico por L-NAME.....	57
3.1.1- Considerações gerais.....	57
3.1.2- Grupos experimentais.....	57
3.1.3- Procedimento experimental- Avaliação Hemodinâmica.....	58
3.2- Protocolo 2- Modelos de inflamação aguda.....	61
3.2.1- Considerações gerais.....	61
3.2.2- Edema da pata.....	61
3.2.3- Modelo de inflamação aguda sistêmica: isquemia e reperfusão hepática e lesão térmica.....	64
3.3- Procedência das substâncias químicas.....	69
3.4- Análise estatística.....	69
4- RESULTADOS.....	71
4.1- Protocolo 1- Modelo de inibição crônica da síntese de óxido nítrico por L-NAME.....	73

4.1.1- Avaliação do peso corporal.....	73
4.1.2- Avaliação da pressão arterial média (PAM).....	73
4.1.3- Fluxo aórtico.....	75
4.1.4- Resistência vascular periférica total (RVPT).....	77
4.2- Protocolo 2– Modelos de inflamação aguda.....	78
4.2.1- Edema da pata.....	78
4.2.2- Modelo de inflamação aguda sistêmica: Isquemia e reperfusão hepática e lesão térmica.....	85
5- DISCUSSÃO.....	95
6- CONCLUSÃO.....	105
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
8- ANEXOS.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
DC	débito cardíaco
DNA	Ácido descaboxirribonucleico
ERO	Espécie reativa derivada do oxigênio
ERN	Espécie reativa derivada do nitrogênio
γ-GT	gama-glutamil transferase
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
I.p.	Intraperitonal
I.pl	Intraplantar
I/R	isquemia e reperfusão
KCl	cloreto de potássio
LDH	lactato desidrogenase
L-NAME	N ω -nitro-L-arginina-metil éster
LT	Lesão térmica
MDA	Malondialdeído
μg /g	micrograma por grama
nM/g	nanomol por grama
NADPH oxidase	nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato-oxidase
NO	óxido nítrico
NO₂	dióxido de nitrogênio
O₂⁻	radical superóxido

$^1\text{O}_2$	oxigênio singlete
$\text{OH}^\bullet$	radical hidroxil
ONOO^-	Peroxinitrito
PAM	Pressão arterial média
$\text{ROO}^\bullet$	Radical peroxil
RS	Radicais tiil
RSO_2	Radicais sulfonil
RVPT	Resistência vascular periférica total
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	superoxido dismutase
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Concentração de licopeno nos tecidos humanos e em rato.....	45
Tabela 2 Quantidade de licopeno nos alimentos.....	46

	Pág.
Figura 1 Estrutura química do Licopeno.....	43
Figura 2 Mecanismo de absorção de licopeno.....	44
Figura 3 Local de dissecação para a cateterização da veia femoral.....	58
Figura 4 Sistema de registro da pressão arterial invasiva.....	59
Figura 5 A aorta foi isolada da artéria pulmonar e cuidadosamente separada através de pinças cirúrgicas para imediatamente ser envolvida pelo fluxômetro.....	60
Figura 6 Apresentação gráfica da evolução do peso corporal.....	73
Figura 7 Valores de pressão arterial média (PAM) obtida por canulação da artéria carótida após 4 semanas de tratamento nos grupos Controle (n=9), Licopeno 5mg (n=9), Licopeno 10mg (n=8), Licopeno 50mg (n=9), Licopeno 100mg (n=8) e L-NAME (n=8).....	74
Figura 8 Valores de pressão arterial média (PAM) obtida por canulação da artéria carótida após 4 semanas de tratamento nos grupos Controle (n=9), Licopeno 5mg + L-NAME (n=9), Licopeno 10mg+ L-NAME (n=9), Licopeno 50mg + L-NAME (n=9), Licopeno 100mg + L-NAME (n=9) e L-NAME (n=8).....	75
Figura 9 Débito cardíaco (DC) após 4 semanas de tratamento nos grupos Controle (n=9), Licopeno 5mg (n=9), Licopeno 10mg (n=9), Licopeno 50mg (n=9), Licopeno 100mg (n=8) e L-NAME (n=8)....	76
Figura 10 Débito cardíaco (DC) após 4 semanas de tratamento nos grupos Controle (n=9), Licopeno 5mg + L-NAME (n=9), Licopeno 10mg + L-NAME (n=9), Licopeno 50mg + L-NAME (n=9), Licopeno 100mg + L-NAME (n=9) e L-NAME (n=8).....	76

Figura 11	Avaliação indireta da Resistência Vascular Periférica Total (RVPT) após 4 semanas de tratamento nos grupos Controle (n=9), Licopeno 5mg (n=9), Licopeno 10mg (n=9), Licopeno 50mg (n=9), Licopeno 100mg (n=8) e L-NAME (n=8).....	77
Figura 12	Avaliação indireta da Resistência Vascular Periférica Total (RVPT) após 4 semanas de tratamento dos grupos Controle (n=9), Licopeno 5mg + L-NAME (n=9), Licopeno 10mg + L-NAME (n=9), Licopeno 50mg + L-NAME (n=9), Licopeno 100mg + L-NAME (n=9) e L-NAME (n=8).....	78
Figura 13	Avaliação da variação do volume da pata em função do tempo no tratamento agudo com licopeno.....	79
Figura 14	Efeito do tratamento agudo com licopeno no tempo de 3 horas após desenvolvimento do edema da pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina.....	80
Figura 15	Efeito do tratamento agudo com licopeno no tempo de 6 horas após desenvolvimento do edema da pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina.....	81
Figura 16	Comparação do efeito do tratamento agudo com licopeno 25mg e Licopeno 50 mg com o efeito da Indometacina no desenvolvimento do edema da pata induzido pela administração intraplantar de carragenina.....	82
Figura 17	Avaliação da variação do volume da pata em função do tempo no tratamento crônico com licopeno.....	83
Figura 18	Efeito do tratamento crônico com licopeno durante 14 dias no tempo de 3 horas após desenvolvimento do edema da pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina.....	84

Figura 19	Efeito do tratamento crônico com licopeno durante 14 dias no tempo de 6 horas após desenvolvimento do edema da pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina.....	85
Figura 20	Avaliação do efeito do tratamento crônico com o Licopeno (25mg/Kg) nos níveis séricos de em (A) alanina aminotransferase (ALT) e em (B) aspartato aminotransferase (AST) após o procedimento de Isquemia e reperfusão (I/R) hepática.....	87
Figura 21	Avaliação do efeito do tratamento crônico com o Licopeno (25mg/Kg) nos níveis séricos de em (A) lactato desidrogenase (LDH) e em (B) gama-glutamyl transferase (γ -GT) após o procedimento de Isquemia e reperfusão (I/R) hepática.....	88
Figura 22	Avaliação do efeito do tratamento crônico com o Licopeno (25mg/Kg) nos níveis teciduais de malondialdeído (MDA) após o procedimento de Isquemia e reperfusão (I/R) hepática.....	89
Figura 23	Avaliação do efeito do tratamento crônico com o Licopeno (25mg/Kg) nos níveis séricos de em (A) alanina aminotransferase (ALT) e em (B) aspartato aminotransferase (AST) na Lesão Térmica (LT).....	91
Figura 24	Avaliação do efeito do tratamento crônico com o Licopeno (25mg/Kg) nos níveis séricos de em (A) Ureia e em (B) Creatinina após o procedimento de Lesão térmica (LT).....	92
Figura 25	Avaliação do efeito do tratamento crônico com o Licopeno (25mg/Kg) nos níveis séricos de Amilase após o procedimento de Lesão térmica (LT).....	93

RESUMO

Objetivos: Estudos epidemiológicos mostrando que o aumento do consumo de tomate ou seus derivados reduz o risco de doenças crônicas como câncer de próstata e doenças cardiovasculares. Esses efeitos benéficos do tomate geralmente são atribuídos ao licopeno, um carotenóide acíclico e com propriedade antioxidante. Este trabalho se propõe analisar o possível efeito protetor do pré-tratamento com licopeno em condições experimentais de hipertensão arterial e propõe ainda avaliar os efeitos do tratamento agudo e crônico com esse carotenóide em modelos de inflamação aguda local e sistêmica. Desta forma, pretende-se contribuir na avaliação da eficácia do consumo regular de alimentos ricos em licopeno na terapêutica e profilaxia associadas aos modelos experimentais deste trabalho.

1º. Avaliar o efeito do pré-tratamento com licopeno nas alterações cardiovasculares funcionais induzidas pela inibição crônica da síntese de óxido nítrico em ratos Wistar;

2º. Avaliar o tratamento com licopeno em modelos de inflamação aguda local (representado pelo modelo de edema da pata) e sistêmica (isquemia e reperfusão hepática e lesão térmica).

Métodos: Na primeira etapa desse estudo foi realizado tratamento com licopeno nas doses de 5, 10, 50 ou 100 mg de licopeno/kg/dia por gavagem associados ou não com L-NAME (45 mg/Kg/dia) por gavagem, por 28 dias. Os parâmetros analisados foram peso corporal, pressão arterial média (PAM), débito cardíaco (DC) e resistência vascular periférica total (RVPT). Na segunda etapa, no modelo de edema da pata, foram empregados dois tipos de tratamento com licopeno: tratamento agudo (1 - 50 mg de licopeno/Kg administradas por via intraperitoneal, 15 minutos antes da injeção de carragenina para indução de edema de pata) e tratamento crônico (25 ou 50 mg de licopeno/kg/dia, por gavagem, por 14 dias antes da injeção de carragenina). Nos modelos de Isquemia e reperfusão (I/R) hepática e lesão térmica (LT), foi realizado o pré-tratamento dos animais com licopeno 25 mg/Kg/dia por 14 dias e, posteriormente, submetidos a I/R ou à LT. Para o protocolo de I/R foram analisados os testes plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) e da gama-glutamil transferase (γ GT). Já para lesão térmica foram analisadas as concentrações plasmáticas de ALT, AST, creatinina, uréia e amilase.

Resultados: Os resultados obtidos na primeira etapa desse estudo mostraram que o licopeno, nas diferentes doses associadas à administração de L-NAME causou aumento significativo da PAM, RVPT e redução no DC.

Os resultados obtidos na segunda etapa desse estudo nos mostraram que o licopeno, tanto no tratamento agudo quanto no tratamento crônico, inibiu significativamente a formação de edema na pata. O tratamento crônico por 14 dias de licopeno também reduziu a lesão hepática provocada pelos dois modelos de inflamação aguda sistêmica, entretanto, não reduziu o grau de lesão em outros tecidos.

Conclusão: O tratamento crônico com licopeno, nas doses usadas, não preveniu as alterações cardiovasculares encontradas no modelo de inibição crônica da síntese de óxido nítrico por L-NAME. Tanto o tratamento agudo quanto o crônico de licopeno exibiram efeito antiinflamatório local, o tratamento crônico limitou o grau de lesão hepática em dois modelos de inflamação sistêmica.

ABSTRACT

Objectives: There is epidemiological data supporting the association between an increased consumption of tomatoes or its products and a reduced risk for developing chronic diseases such as prostate cancer and cardiovascular disease. These beneficial effects are generally attributed to the antioxidant properties of lycopene, an acyclic carotenoid with 11 linearly arranged conjugated double bonds.

Hence, we evaluated the influence of lycopene in the prevention of haemodynamics alterations found in a hypertension model induced by chronic treatment with L-NAME and we also evaluated the anti-inflammatory effect of lycopene in experimental acute inflammation model.

Methods: To evaluate the influence of lycopene in the prevention of haemodynamics alterations found in an endothelial dysfunction model induced by chronic treatment with L-NAME, lycopene was administered by gavage and the dosages were 5, 10, 50 or 100 mg of the lycopene/Kg/day, during 28 day. The analyzed parameters were body weight, tail-cuff blood pressure (TCP), mean arterial pressure (MAP), cardiac output (CO) and total peripheral vascular resistance (TPVR).

To evaluate the effects of lycopene in local inflammation, a carrageenan induced paw edema model, lycopene was administered as an acute treatment (1, 10, 25 or 50 mg of the lycopene/Kg, intraperitoneal (i.p.), 15 minutes before the carrageenan injection) and as a chronic treatment (25 or 50 mg of the lycopene/kg/day, gavage, during 14 days before the carrageenan injection).

The evaluation of the liver ischemia-reperfusion and burn injury model, lycopene was administered chronically (25mg/Kg) during 14 days. Injury was assessed by measurement of the. In this model, lycopene was administered daily at two doses (25mg/kg and 50mg/kg) in the 14 days that preceded the experiments.

After I/R process, it was measured serum levels of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, lactate dehydrogenase and gamma-glutamyl transferase. After burn injury experiment, it was measured aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, creatinine, urea and amilase.

Results: The results obtained in the part of in this study showed that the chronic administration of L-NAME and chronic treatment with lycopene plus L-NAME induced to the significant increase of MAP, TPVR and reduction in CO.

The second part, results showed that lycopene significantly inhibited rat paw edema formation at two doses (25 and 50 mg/Kg) in both acute and repeated administration. Repeated administration of lycopene also reduced liver injury induced by ischemia-reperfusion and by burn injury.

Conclusion: The chronic treatment with lycopene did not prevent the functional cardiovascular alterations found in the model of chronic inhibition of the synthesis of nitric oxide by L-NAME. However, lycopene exhibits local anti-inflammatory activity in the carrageenan-induced paw edema model and attenuates liver injury induced by ischemia reperfusion and burn injury.

1- INTRODUÇÃO

A alimentação há muito tempo deixou de ser considerada apenas como uma das necessidades básicas dos seres humanos. A alimentação hoje é impregnada de outros sentimentos como prazer e expressão de sentimentos, que vão além da busca para a satisfação da fome. No contexto nutricional, o alimento também exerce uma função suplementar ao da satisfação do apetite. Hipócrates, o pai da medicina, no século V a.C. dizia que “O seu alimento seja sua medicina e que a sua medicina seja seu alimento”, enfatizando com isso, a importância de certos alimentos no avanço do conceito de que a nutrição, além de ser fonte de energia e substratos, também exerce função importante na manutenção da saúde e na prevenção de doenças. Nesse contexto, na década de 80, no Japão era observado que além do prazer gastronômico e fornecimento de nutriente e energia, o alimento também era capaz de atuar na prevenção de doenças (Arai, 1996). Deste modo criou-se o termo de alimentos funcionais.

Alimento funcional é aquele alimento que é convencionalmente consumido como parte de uma alimentação normal, nas quantidades adequadas e suficientes para produzir, além da sua função nutricional básica, efeitos metabólicos ou fisiológicos desejáveis na manutenção da saúde, promovendo o bem-estar físico e mental e prevenindo o aparecimento precoce de doenças degenerativas (Lopez-Varela *et al.*, 2002). Dentre os diversos efeitos benéficos que os alimentos funcionais podem desempenhar destacamos efeito antioxidante.

Assim, o tomate é um dos alimentos que atualmente têm sido estudados como alimentos funcionais. De fato, estudos epidemiológicos têm associado o aumento do consumo desse produto e redução de doenças crônicas como câncer e patologias cardiovasculares (Canene-Adams *et al.*, 2005). Pacientes com hipertensão arterial grau 1, mostrou redução na pressão arterial quando submetidos ao tratamento diário com extrato de tomate em cápsula, durante 8 semanas, evidenciando para o benefício desse alimento na manutenção da saúde (Engelhard *et al.*, 2005). Em camundongos, a ingestão diária de extrato de tomate concomitantemente à indução da hipercolesterolemia durante 4 meses, reduziu a peroxidação lipídica, bem como a disfunção endotelial induzidas pela hipercolesterolemia (Saganuma & Inakuma, 1998). Além disso, o uso de derivados de tomate melhorou o perfil lipídico de ratos hiperlipêmicos (Ibrahim, Ahmed & El-Din, 2008).

Em todos os países, o tomate é um dos vegetais mais consumidos e populares. Estima-se que o consumo médio por indivíduo nos Estados Unidos, em 2001, foi de, aproximadamente, 8 kg de tomate fresco e 31 kg de tomate processado (forma mais freqüentemente consumida). Quanto ao caráter nutricional, tomate é fonte de diversos nutrientes como vitaminas do complexo A e do complexo B, minerais como fósforo e potássio, ácido fólico, cálcio e licopeno (Canene-Adams *et al.*, 2005). Dentre os nutrientes citados presentes no tomate, o licopeno é o que está em maior quantidade, apresentando-se na concentração de 60 % (Clinton SK, 1995) e, por essa razão, justificando os estudos que associam os efeitos benéficos do tomate à ação do licopeno.

No que se refere à prevenção do câncer de próstata pela dieta rica em tomate ou seus produtos derivados, há evidências epidemiológicas que associam essa proteção à ação biológica do licopeno (Giovannucci E *et al.*, 1995; Giovannucci E, 2005; Bunker CH *et al.*, 2007; Schwarz S *et al.*, 2008), estudos *in vivo* (Siler U *et al.*, 2005; Tang L *et al.*, 2005) e em estudos *in vitro* (Obermüller-Jevic UC *et al.*, 2003; Tang L *et al.*, 2005; Liu X, Allen JD, Arnold JT *et al.*, 2008).

Além disso, há consideráveis evidências que também confirmam o efeito benéfico do licopeno na prevenção de doenças cardiovasculares (Clinton SK, 1998; Arab L & Steck S, 2000; Riccioni *et al.*, 2008). Assim, o pré-tratamento com 1 mg de licopeno por dia durante 31 dias proporcionou ação cardioprotetora em modelo de isquemia e reperfusão de miocárdio de ratos (Bansal P *et al.*, 2006).

Outra propriedade relacionada ao licopeno é sua ação na inflamação crônica onde o pré-tratamento com esse nutriente reduziu o estresse oxidativo e reduziu o estado inflamatório no modelo experimental de colite (Reifen R *et al.*, 2004).

Licopeno: estrutura química, absorção, distribuição tecidual e mecanismo de ação

O licopeno é uma substância carotenóide, sem atividade pró-vitamina A, composto por 11 ligações conjugadas e duas duplas ligações não conjugadas (Figura 1), de caráter lipossolúvel (Shami & Moreira, 2004). O organismo humano não é

bioquimicamente capaz de sintetizar licopeno sendo necessária sua obtenção através da ingestão de alimentos que sejam fontes desse nutriente como pimentão, melancia, mamão, goiaba vermelha e principalmente o tomate e outros alimentos de coloração avermelhada, sendo vegetal que apresenta maior quantidade dessa substância e estima-se que 85 % da ingestão de licopeno, seja através do consumo de tomate ou seus derivados (Moritz & Tramonte, 2006). A quantidade de licopeno nos vegetais é regulada pela enzima licopeno-ciclase que transforma licopeno em β -caroteno, comprometendo não somente a coloração avermelhada do vegetal, mas também o valor nutricional quanto a quantidade de licopeno (Heber & Lu, 2002).

Se por um lado, as quantidades de licopeno presentes nos vegetais são reguladas pela enzima licopeno-ciclase, a estrutura química do licopeno também apresenta variações de *cis* e *trans*-licopeno que também é um dos fatores que interferem na sua biodisponibilidade. Nos vegetais frescos, a forma isomérica do licopeno é *trans*-licopeno (*all-trans*) (Figura 1B) que é mais estável, mas pouco absorvido. Já com o processamento desses vegetais pode ocorrer acarretar em degradação dessa forma e essas formas de degradação são a isomerização, que é a forma *cis*-licopeno (Figura 1B) que é mais instável, entretanto melhor absorvida, e a forma de degradação por oxidação.

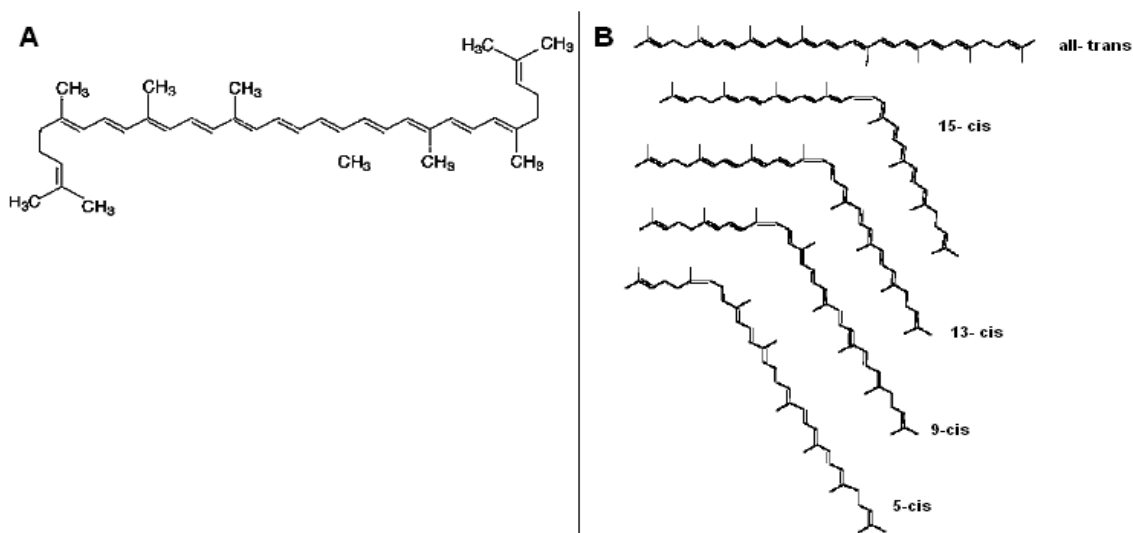


Figura 1- Estrutura química do Licopeno (Di Mascio, Kaiser & Sies, 1989)

A absorção de licopeno, segundo Boileau (2002), sugere que o licopeno seja transportado entre as células por proteínas específicas ou migre agregado a gotas lipídicas, formando micelas. No enterócito, licopeno não é transportado como outros carotenóides com atividade por-vitamina A, que são metabolizados em vitamina A ou retinol. Entretanto, metabólitos oxidativos do licopeno têm sido encontrado em soros humanos, embora pouco se saiba sobre os locais e mecanismos envolvidos na sua formação (Clinton, 1998; Boileau *et al.*, 2002). O licopeno é liberado dos enterócitos incorporados a quilomícrons, é então transportado para todo o corpo pelo sistema linfático (Figura 2), e pela ação da enzima lipase lipoprotéica é retirado desses quilomícrons e absorvido de forma passiva para vários tecidos, incluindo fígado, adrenais, adipócitos, esplênicos e órgãos reprodutivos (Tabela 1) (Boileau *et al.*, 2002). Esses carotenóides podem se acumular no fígado ou ser envolvidos pela lipoproteína de baixa densidade VLDL e levados novamente ao sangue (Boileau *et al.*, 2002).

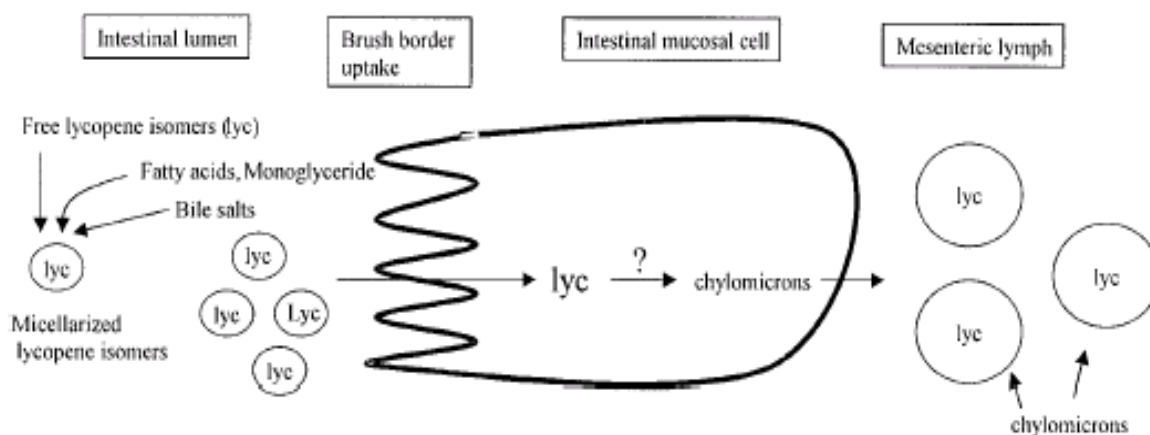


Figura 2- Mecanismo de absorção de licopeno. (?) Pouco se conhece sobre o transporte entre a mucosa intestinal e o mecanismo pelo qual ele se agrega aos quilomícrons (Boileau, 2002).

Há alguns fatores que podem interferir com a biodisponibilidade do licopeno. A forma do produto consumido como fonte de licopeno também é um fator importante, pois verificou-se que o consumo de derivados de tomates como molho de tomate aumenta

as concentrações séricas de licopeno quando comparada ao consumo do tomate fresco ou cru (Tabela 2). A ingestão de molho de tomate cozido em óleo aumentou ainda mais a concentração sérica de licopeno. A diferença de biodisponibilidade é sugerida pela forma isomérica. Clinton (1998) sugere que essa diferença está relacionada com a forma isomérica onde o alimento fresco possui maior quantidade de *trans*- licopeno e comparando com a forma encontrada nos tecidos e no soro, a forma mais encontrada é a *cis*-licopeno (Clinton, 1998). Além disso, estudos sugerem que a forma *cis* de licopeno é melhor absorvida do que a forma *all trans* e a sugestão para esse fato é pela forma *cis* se solubilizar melhor nas micelas (Boileau *et al.*, 2002). E adicionalmente a essas informações, o processamento térmico dos alimentos contendo licopeno melhora a biodisponibilidade por romper a parede celular e extrair o licopeno contido nos cromoplastos e também sugere-se que o processo térmico contribui para isomerização de *trans* para *cis*-licopeno (Boileau *et al.*, 2002).

Tabela 1- Concentração de licopeno nos tecidos humanos e em rato

	Espécie/Tecido	Concentração de licopeno (nM/g)	Referências
Humano	Fígado	0,1-20,7	Kaplan, 1990
	Adrenal	0,2-21,6	Kaplan, 1990; Stahl, 1992
	Sangue	0,26-0,9*	Gerster, 1997
	Próstata	0,0-1,7	Freeman, 2000
	Pulmão	0,1-4,2	Boileau, 2000
Ratos	Fígado	5-223	Boileau, 2000
	Adrenal	80-85	Boileau, 2000
	Sangue	0,02-0,23*	Boileau, 2000
	Próstata	0,02-0,24	Boileau, 2000
	Pulmão	0,065-0,70	Boileau, 2000

*Concentração do sangue de licopeno expresso em nmol/mL (Boileau *et al.*, 2002).

O mecanismo de ação para o efeito protetor do licopeno está associado a seu efeito antioxidante, ação conferida pela presença das duplas ligações conjugadas, tendo um poder mais efetivo na remoção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Di mascio *et al.*, 1989). Outras espécies reativas que o licopeno é capaz de remover são dióxido de nitrogênio (NO_2),

radicais tiil (RS), radicais sulfonil (RSO₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Clinton, 1998) e peroxinitrito (ONOO⁻) (Muzandu *et al.*, 2006). Embora as propriedades antioxidantes do licopeno sejam consideradas as maiores responsáveis por seus benefícios (Devaraj *et al.*, 2008), evidências vêm indicando que outros mecanismos também podem estar envolvidos nos benefícios trazidos pelo uso de alimentos que são fontes desse nutriente. O aumento da concentração de licopeno pode regular as funções dos genes, modulação de junções de comunicação entre as células (gaps) modulação das respostas hormonais, imunológicas (Agarwal & Rao, 2000) e enzimáticas (Fuhrman *et al.*, 1997).

Tabela 2- Quantidade de licopeno nos alimentos

Produto	Licopeno (µg /g do produto)
Tomate fresco	31±20
Purê de tomate em caixinha	133±8
Purê de tomate em lata	114±89
Pasta de tomate em lata	164±53
Catchup	103±41
Mamão	19±4
Pitanga	73±1
Goiaba vermelha	53±20

Fonte: Shami & Moreira, 2004

Os valores estão expressos em média±desvio padrão

Espécies Reativas: sistema de equilíbrio e relação com doenças

A terminologia espécies reativas inclui os radicais livres (que são moléculas altamente reativas e que possuem número ímpar de elétrons desemparelhado na última camada) e outras moléculas que embora não possuam a característica que define radical livre, ou seja, não possuem elétron desemparelhado, são muito reativas em decorrência de seu

caráter instável. Os principais tipos de espécies reativas formadas em todo e qualquer ser vivo aeróbico são as Espécies Reativas derivadas do Oxigênio (ERO) e as Espécies Reativas derivadas do Nitrogênio (ERN) (Sies & Cadenas, 1985; Bergendi et al., 1999; Dröge, 2002).

As ERO e ERN são geradas no processo metabólico normal aeróbico das células em compartimentos como citoplasma, mitocôndrias ou membrana celular e em baixa/moderadas concentrações são fisiologicamente importantes para diversas funções do organismo como resposta celular, regulação do tônus vascular, defesa contra agentes agressores, vias de sinalização celular e indução da resposta mitogênica (Bergendi *et al.*, 1999; Dröge, 2002) exercendo assim efeito benéfico e fundamental ao organismo. Além disso, as próprias espécies reativas, por seu caráter reativo, auxiliam no equilíbrio redox.

As principais espécies reativas geradas pelo organismo humano são radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($OH^\bullet$), radical peroxil ($ROO^\bullet$), oxigênio singlet (1O_2), óxido nítrico (monóxido de azoto) (NO), peroxinitrito ($OONO^-$) (Sies & Cadenas, 1985; Bergendi et al., 1999).

Para manter as proporções ideais quanto às quantidades dessas espécies reativas, ou seja manter as concentrações de espécies reativas em níveis que as células conseguem tolerar ou se adaptar sem gerar consequências como lesão (reversíveis ou irreversíveis) nas células, o organismo possui, naturalmente um sistema de controle.

Esse sistema de controle do equilíbrio entre condições pró-oxidantes e antioxidantes atua em três linhas específicas:

- A) prevenção da formação de espécies reativas: esse mecanismo de defesa é um sistema antioxidante mais amplo, ou seja, age estabilizando o radical livre, não deixando elétron desemparelhado e assim diminuindo a reatividade dos radicais livres; age na quelação de metais que podem agir como catalisadores ou transportadores de elétrons nas reações químicas com espécies reativas (YU, 1994; Sies, 1993; Dröge, 2002).
- B) eliminação de espécies reativas formadas: que pode ser enzimático e não enzimático. O sistema enzimático age interceptando a espécie reativa já formada e deixando as concentrações dessas espécies reativas dentro do que são fisiologicamente benéficas, exemplos de enzimas desse sistema são glutathione redutase (GSH-R), glutathione

transferase (GST), glutationa-peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD), catalase, e as enzimas do sistema tioredoxina (tioredoxina e tioredoxina redutase). Já o sistema antioxidante não enzimático é composto por moléculas (exógenas ou endógenas) que atuam na proteção de alvos biológicos da ação das espécies reativas, exemplos de antioxidante exógenos que podem ser de componentes da dieta e de caráter lipofílico (protegendo os compartimentos apolares das células) e hidrofílicos (protegendo os compartimentos polares das células), ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol carotenóides, compostos fenólicos (YU, 1994).

C) Reparo de moléculas danificadas pelas espécies reativas: o mecanismo de reparo mais conhecido é o Sistema de reparo do DNA que são ativados quando o sistema antioxidante não consegue impedir os danos ao DNA, levando a injúrias oxidativas incluindo modificações nas bases, açúcares etc. Os mecanismos de reparo do DNA são reparo de excisão de bases (REB), reparo de excisão de nucleotídeo (REN) e reparo de erro de pareamento (REP). As ações das proteases e fosfolipases também são consideradas como forma de reparo (Lunec et al., 2002; Dröge, 2002).

O rompimento do estado de equilíbrio formado entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes favorece o aumento na concentração além do ideal de espécies reativas resultando no estresse oxidativo, que é um processo deletério que pode gerar consequências como lesão em certas estruturas celulares, incluindo lipídeos de membrana, proteínas, carboidratos e DNA.

Como exemplos de reações das espécies reativas com estruturas celulares levando à alteração de suas funções são os ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares e organelas são alvos susceptíveis de oxidação pelas espécies reativas (Sies, 1985; Dröge, 2002). Os mecanismos propostos para lipoperoxidação sugerem a participação do radical hidroxil, oxigênio molecular e ferro. A reação inicia-se com separação de hidrogênio do ácido graxo, formando radical lipídico que reage com o oxigênio molecular, levando a uma reação em cadeia formando produtos de quebra como malondialdeído. A reação em cadeia gerada durante esse processo, se não forem cessadas, pode levar a destruição da fase lipídica, alterando a estrutura de membrana e mudança de partículas lipoproteicas, além disso pode gerar produtos que podem provocar lesão em

outras estruturas celulares como as proteínas. Já com as proteínas podem ser oxidadas, com ação catalisadora de metais como o ferro, oxidando aminoácidos presentes nas cadeias protéicas alterando a função das proteínas (Sies, 1985). Os danos ao DNA envolvem clivagem da ligação fosfodiéster, alteração de ribose e oxidação de bases e o acúmulo dessas lesões, pode levar a mutagênese e carcinogênese (Sies, 1985; Toyokuni, 2008).

As alterações em estruturas celulares provocadas pelas espécies reativas têm sido associadas à fisiopatologia de diversas doenças como disfunção endotelial, aterosclerose, inflamações, câncer, catarata, artrite, doença de Parkinson, diabetes, câncer e envelhecimento. A questão é a compreensão se as espécies reativas são a causa ou a consequência da perda da homeostase celular.

Por haver diversas condições patológicas, especialmente nas doenças cardiovasculares e em processos inflamatórios, associadas ao estresse oxidativo, o conhecimento dessas condições pode levar ao progresso nos âmbitos preventivos e terapêuticos dessas doenças.

Alimentos que contém compostos antioxidantes como vitamina C, vitamina E, vitamina A, flavonóides, carotenóides e outros, são capazes de restringir as lesões nos tecidos induzidos pelo estresse oxidativo.

Com relação às doenças cardiovasculares, Ulker e colaboradores, (2003), demonstraram que o uso de vitamina C (ácido ascórbico) e vitamina E (α - tocoferol) melhoraram a função endotelial devido à redução da produção de ânion superóxido, através da diminuição da ativação da NADPH oxidase e aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial, em aorta de ratos espontaneamente hipertensos (Ulker, S, et al 2003). Essas vitaminas também foram eficientes contra danos provocados por espécies reativas em cardiomiócitos isolados (Rinne *et al.*, 2000).

Vitamina C também foi efetiva na redução da pressão arterial em modelo experimental de hipertensão doca-sal, onde esse modelo também tem bases no estresse oxidativo (Ettarh *et al.*, 2002).

Estudos têm demonstrado a relação entre a presença de flavonóides e redução da disfunção endotelial (Hertog *et al.*, 1993; Hertog *et al.*, 1995; Dell'Agli, Busciala, Bosisio, 2004), pois essas substâncias agem aumentando a expressão da enzima óxido

nítrico sintase, diminuindo, assim a expressão das moléculas de adesão (Landolfi *et al*, 1984; Dell'Agli, Busciala, Bosisio, 2004), e removendo radicais livres derivados do oxigênio (Dell'Agli, Busciala, Bosisio, 2004).

Processos inflamatórios também estão associados ao estresse oxidativo (Fantone & Ward, 1982; Winrow *et al.*, 1993; Conner & Grishan, 1996). Lesões teciduais induzidas por isquemia e reperfusão, que é um processo inflamatório, associado ao estresse oxidativo (Ferrari *et al.*, 1990) vitaminas com atividade antioxidante têm sido estudadas para reduzir o grau dessas lesões. Dessa forma, vitamina C e vitamina E apresentaram efeito citoprotetor em lesões teciduais induzidas por isquemia e reperfusão (Taha *et al.*, 2004a; Taha *et al.*, 2004b).

Em suma, sabe-se que o efeito protetor do tomate contra o câncer e doenças cardiovasculares está relacionado com a presença de licopeno que é o composto em maior concentração no tomate em relação aos outros nutrientes e que a propriedade benéfica atribuída ao licopeno é principalmente por sua ação antioxidante. Além disso, há estudos que comprovam os benefícios do uso de nutrientes e vitaminas com propriedade antioxidante em diversas patologias cardiovasculares com base na redução do estresse oxidativo.

Diante disso, o presente trabalho propõe analisar o possível efeito protetor do pré-tratamento com licopeno nas alterações cardiovasculares induzidas pela hipertensão arterial experimental, assim como avaliar os efeitos do tratamento agudo e crônico com esse carotenóide em modelos de inflamação aguda local e sistêmica, contribuindo assim, para avaliar se o consumo regular de alimentos ricos em licopeno contribui na profilaxia de danos provocados por estes tipos de patologias.

2- OBJETIVOS

- 1-** Avaliar se o tratamento crônico com licopeno exerce efeito protetor contra alterações cardiovasculares induzidas pelo no modelo de inibição crônica da síntese de óxido nítrico;
- 2-** Avaliar os efeitos do tratamento crônico com licopeno em modelos de inflamação aguda local e sistêmica.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Protocolo 1- Modelo de inibição crônica da síntese de óxido nítrico por L-NAME

3.1.1- Considerações Gerais

Para este protocolo foram utilizados ratos machos da cepa Wistar provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com idade entre oito e dez semanas, pesando entre 150 e 200 gramas no início do tratamento. Os animais foram colocados em gaiolas coletivas, em número máximo de cinco animais por unidade, no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Os ratos foram mantidos em ciclos circadianos, artificialmente, com doze horas de período diurno e com doze horas de período noturno. Os animais receberam água e ração Purina (contendo 2,3 mg de sódio por grama de ração) “ad libitum”.

Essa etapa do trabalho está de acordo com o guia de cuidados e uso de animais de laboratório publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América. Os procedimentos experimentais usados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Bioética Local de Pesquisa Animal.

3.1.2- Grupos experimentais

Para avaliar o efeito do pré-tratamento com licopeno nas alterações cardiovasculares funcionais induzidas pela inibição crônica da síntese de óxido nítrico em ratos Wistar foram utilizados 10 grupos experimentais.

Nos grupos que receberam o licopeno, receberam doses variadas dessa substância onde essas doses foram de 5 mg de licopeno/Kg de peso animal, 10 mg de licopeno/Kg de peso animal, 50 mg de licopeno/Kg de peso animal ou 100 mg de licopeno/Kg de peso animal diariamente por 28 dias.

O licopeno foi disperso em água destilada e o L-NAME dissolvido em água de torneira. A via de administração utilizada para essas substâncias foi gavagem.

Para todos os grupos a alimentação convencional foi mantida.

Os grupos experimentais foram distribuídos da seguinte forma:

- (1) Controle: ratos receberam água destilada, por gavagem;
- (2) (3) (4) (5) Licopeno: ratos receberam 5, 10, 50 ou 100 mg de licopeno/kg/dia;
- (6) L-NAME: ratos receberam 45 mg de L-NAME/kg/dia (Moreno Jr H, *et al*, 1997);
- (7) (8) (9) (10) Licopeno + L-NAME: ratos receberam 5, 10, 50 ou 100 mg de licopeno/kg/dia de e 45 mg de L-NAME/kg/dia (Moreno Jr H, *et al*, 1997).

3.1.3- Procedimento experimental- Avaliação Hemodinâmica

3.1.3.1- Avaliação da pressão arterial média (PAM)

Após o período de tratamento, os animais foram anestesiados com uretano (1,2 g/Kg) e submetidos a cateterização da artéria carótida para registro direto da pressão arterial e da veia femoral para manutenção de anestesia, se necessária. (Figura 3 e 4). Os animais foram entubados com cânula endotraqueal para assistência ventilatória e essa cânula foi conectada a um respirador (Pressure Controlled Ventilador Kent Scientific 325 Norfolk RD – Litchfield CT 06759 – USA). Durante a cirurgia os animais foram mantidos com volume corrente de 2,5ml de O₂ e frequência respiratória de aproximadamente 56 movimentos por minuto.

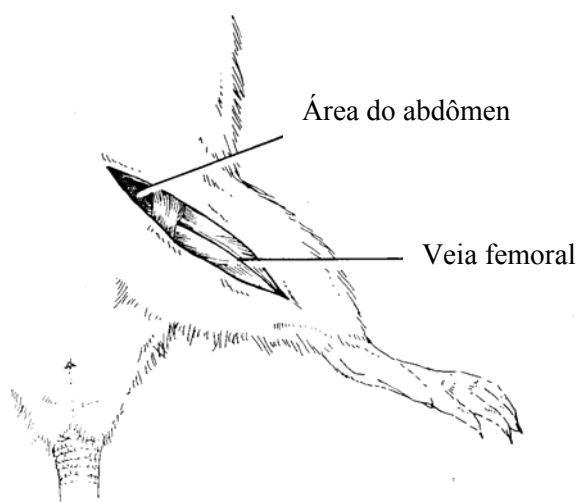


Figura 3- Local de dissecação para a cateterização da veia femoral (Imagem cedida pela Professora Dra Silvia Lacchini)

O cateter arterial foi mantido com solução de heparina. A pressão arterial média (PAM) foi monitorada através de transdutor de pressão previamente calibrado. O sinal da PAM foi amplificado e processado por uma placa analógico-digital conectada a um computador. Os registros foram analisados pelo programa WINDAQ (DATAQ Instruments Windaq, Version 1.78, Akron, OH, EUA) e Advanced Cudas (DATAQ Instruments, Calç Package, Version 3.19, EUA).

O programa WINDAQ permite a análise dos pulsos de pressão batimento-a-batimento, para obtenção de valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e FC. A PAM foi obtida a partir da integração dos valores de pressão entre duas detecções consecutivas da pressão diastólica (Irigoyen, *et al* 1991).

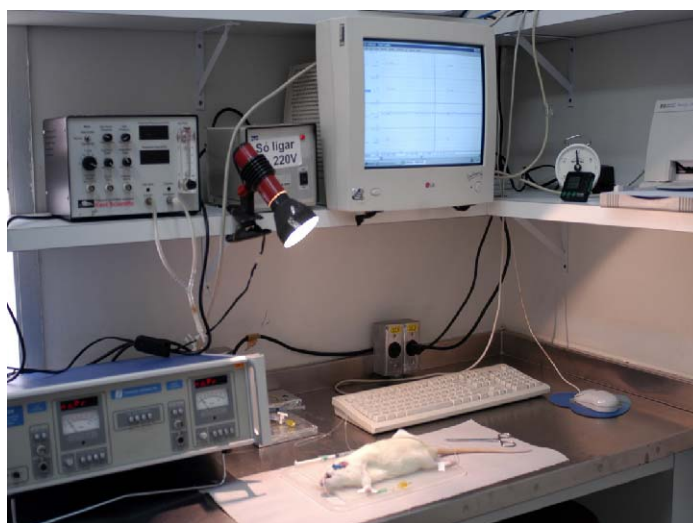


Figura 4- Sistema de registro da pressão arterial invasiva

3.1.3.2- Fluxo Aórtico

Após registro direto de 15 minutos de pressão arterial sistêmica foi feita a medição do fluxo sanguíneo na raiz da aorta, como estimativa do débito cardíaco (DC). Para essa técnica foram utilizadas sondas ultrassônicas (Transonic® Flowprobe - Transonic Systems Inc. NY, EUA) que são constituídas por uma placa acústica refletora em formato

de gancho, com um dispositivo que permite a abertura e o fechamento, possibilitando o envolvimento do vaso sanguíneo.

Para esta técnica implantamos uma sonda na artéria aorta ascendente, através de uma incisão na altura do terceiro espaço intercostal direito, através da qual foi possível acessar à cavidade torácica. A aorta ascendente foi dissecada e isolada e a sonda ultrassônica devidamente posicionada (Figura 5). Após a colocação da sonda a incisão da pele foi suturada com fio de algodão.

Os registros de fluxo aórtico foram monitorados e gravados durante 15 minutos após estabilização dos mesmos. A análise destes registros foi feita utilizando-se o mesmo programa descrito para a análise da PAM.

Ao final do procedimento, os animais foram sacrificados com cloreto de potássio injetado através da veia femoral canulada.

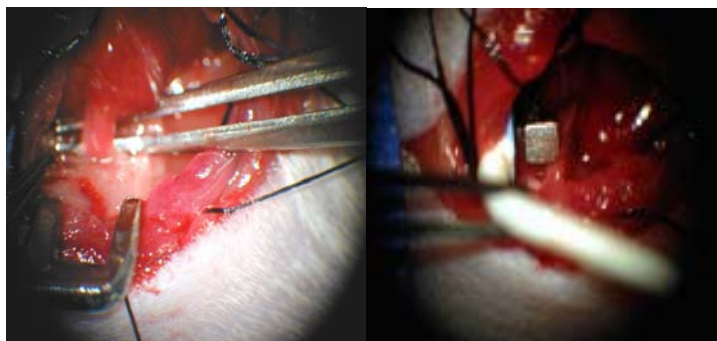


Figura 5- A aorta foi isolada da artéria pulmonar e cuidadosamente separada através de pinças cirúrgicas para imediatamente ser envolvida pelo fluxômetro (Foto cedida pela Dra Silvia Elaine F. Melo).

3.1.3.3- Resistência Vascular Periférica Total (RVPT)

A resistência vascular periférica (RVPT, mmHg/mL) foi estimada através do cálculo da razão entre a PAM (mmHg), medida diretamente através da canulação da artéria carótida, e o DC (mL/min), obtido através da medida do fluxo da artéria aorta ascendente. (RVPT = PAM/DC).

3.2- Protocolo 2- Modelos de inflamação aguda

3.2.1- Considerações gerais

Para a realização dessa etapa do estudo utilizaram-se ratos machos da raça Wistar (para os experimentos de edema da pata- com peso entre 150-200 g, isquemia e reperfusão de fígado- com peso entre 250-320 g e queimadura- com peso entre 300-350 g) provenientes da Harvard Ibérica, os quais foram sujeitos a um período de aclimação até obtenção do peso ideal para experimentação no biotério de manutenção da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, à temperatura de 25°C e com ciclos de luz de 14 horas diárias, com uma dieta de manutenção IPM-R20 (Letica) e água *ad libitum*.

Todos os animais foram manuseados em concordância com *Guidande in the Operation of the Animals (Scientific Procedures) Act 1986*, publicada pela *Her Majesty's Stationery Office*, bem como com as regulamentações da Comunidade Europeia (Jornal Oficial da Comunidade Europeia L 358/1 de 18/12/1986).

3.2.2- Edema da pata

3.2.2.1- Grupos experimentais

Para realização da avaliação do efeito do licopeno no modelo de inflamação aguda por edema de pata, foram estudados dois tipos de tratamento com o licopeno, tratamento agudo e tratamento crônico.

A substância usada como estímulo inflamatório foi a λ -carragenina 1% que foi diluída em soro fisiológico estéril.

Os grupos experimentais foram distribuídos da seguinte forma:

Tratamento agudo

O licopeno para esse protocolo foi disperso em soro fisiológico estéril e a via de administração foi intraperitonal (i.p.).

- (1) Controle: animais foram pré-tratados com soro fisiológico estéril (1 mL/kg; i.p.) 15 minutos antes da administração de 0,1 mL soro fisiológico estéril por via intraplantar (i.pl.);
- (2) Carragenina: animais foram pré-tratados com soro fisiológico estéril (1 mL/kg; i.p.) 15 minutos antes da indução de edema de pata através da administração intraplantar (i.pl.) de 0,1 mL da dispersão λ carragenina 1%;
- (3) Licopeno 1mg: animais foram pré-tratado com licopeno por via intraperitoneal (i.p.) (1 mg de licopeno/Kg) 15 minutos antes da indução de edema de pata através da administração intraplantar (i.pl.) de 0,1 mL da dispersão λ carragenina 1%;
- (4) Licopeno 10mg: animais foram pré-tratado com licopeno por via intraperitoneal (i.p.) (10 mg de licopeno /Kg) 15 minutos antes da indução de edema de pata através da administração intraplantar (i.pl.) de 0,1 mL da dispersão λ carragenina 1%;
- (5) Licopeno 25mg: animais foram pré-tratado com licopeno por via intraperitoneal (i.p.) (25 mg de licopeno /Kg) 15 minutos antes da indução de edema de pata através da administração intraplantar (i.pl.) de 0,1 mL da dispersão λ carragenina 1%;
- (6) Licopeno 50mg: animais foram pré-tratado com licopeno por via intraperitoneal (i.p.) (50 mg de licopeno /Kg) 15 minutos antes da indução de edema de pata através da administração intraplantar (i.pl.) de 0,1 mL da dispersão λ carragenina 1%;
- (7) Indometacina: animais foram pré-tratado com indometacina por via intraperitoneal (i.p.) (10 mg /Kg) 15 minutos antes da indução de edema de pata através da administração intraplantar (i.pl.) de 0,1 mL da dispersão λ carragenina 1%

Tratamento crônico

Os animais foram submetidos ao pré-tratamento com licopeno (que para esse protocolo foi disperso em água destilada) ou água destilada, por gavagem, por 14 dias. Para manutenção da dose, os animais foram pesados 4 vezes por semana.

- (1) Controle: animais foram submetidos ao tratamento com água destilada (1 mL/kg) e ao final desse tratamento os animais foram submetidos à administração de 0,1 mL soro fisiológico estéril por via intraplantar (i.pl.);
- (2) Carragenina: animais foram submetidos ao tratamento com água destilada (1 mL/kg) e ao final desse tratamento os animais foram submetidos à indução de edema de pata através da administração intraplantar (i.pl.) de 0,1 mL da dispersão λ carragenina 1%;
- (3) Licopeno 25mg: animais foram tratados com licopeno (25 mg de licopeno/Kg) e ao final desse tratamento animais foram submetidos à indução de edema de pata através da administração intraplantar (i.pl.) de 0,1 mL da dispersão λ carragenina 1%;
- (4) Licopeno 50mg: animais foram tratados com licopeno (50 mg de licopeno/Kg) e ao final desse tratamento animais foram submetidos à indução de edema de pata através da administração intraplantar (i.pl.) de 0,1 mL da dispersão λ carragenina 1%.

3.2.2.2- Procedimento experimental- Edema da pata

Primeiramente marcou-se com caneta a articulação da pata esquerda de cada rato (ao nível do maléolo). O volume da pata foi medido através de um pletismômetro (Digital Plethysmometer LE 7500 – Leticia[®] Scientific Instruments) onde a pata marcada foi mergulhada em um recipiente contendo a solução do pletismômetro (solução de Triton X-100 a 0,15% (V/V) e cloreto de sódio a 0,1% (m/V) em água bidestilada) fazendo coincidir a marcação na articulação da pata esquerda com a marcação existente no recipiente garantindo que a pata é mergulhada sempre à mesma altura.

A λ -carragenina, usada como estímulo inflamatório, foi administrada por via intraplantar na pata esquerda de cada rato (exceto no grupo controle, ao qual se administrou soro fisiológico).

Ao momento da administração da λ -carragenina atribuiu-se o tempo zero (t=0h), procedendo-se então à medição do volume da pata esquerda, repetindo-se esta medição 3 horas (t=3h), 6 horas (t=6h) e 24 horas (t=24h) (para os grupos que tiveram a medição das 24 horas) após o estímulo inflamatório. O volume medido antes de qualquer administração é designado por Vprecarr (Volume pré carragenina), o volume medido a

zero hora (V0), 3 horas (V3), 6 horas (V6) e 24 horas (V24) após administração de λ -carragenina.

Os resultados obtidos foram expressos na diferença da variação do volume da pata obtidos em função do tempo e nos dois tempos onde se observou maior aumento de volume da pata utilizou-se a fórmula da porcentagem seguindo a fórmula:

$$\%V = \frac{V_x - V_{\text{precarr}}}{V_{\text{precarr}}} \times 100$$

V_x onde X= 3 ou 6

3.2.3- Modelo de inflamação aguda sistêmica: Isquemia e reperfusão hepática e lesão térmica

Para realização da avaliação do efeito do licopeno no modelo de inflamação aguda sistêmica, foram usados dois modelos experimentais: isquemia e reperfusão (I/R) hepática e lesão térmica (LT), e para esses dois modelos, foram estudados somente o pré-tratamento com o licopeno, em uma só dose segundo os grupos experimentais descritos nos itens 3.2.3.1.1 e 3.2.3.2.1. Para manutenção da dose, os animais foram pesados 4 vezes por semana.

3.2.3.1- Isquemia e reperfusão hepática

Para esse estudo, os animais do grupo licopeno foram submetidos ao pré-tratamento com licopeno, que foi disperso em água destilada, os animais do grupo sham e I/R receberam apenas o veículo onde foi disperso o licopeno, ou seja, água destilada. A via de administração foi gavagem e o tempo de tratamento foi 14 dias.

3.2.3.1.1- Grupos experimentais

- (1) Controle: os animais não foram tratados e não sofreram qualquer tipo de procedimento cirúrgico ou manipulação hepática;
- (2) Sham: ratos foram tratados com água destilada e terminado o período de tratamento os ratos foram sujeitos a procedimentos cirúrgicos para canulação da traquéia e da veia jugular, que serão melhores descritos no item 3.2.3.1.2;
- (3) I/R: ratos foram tratados com água destilada e terminado o período de tratamento os ratos foram sujeitos a procedimentos cirúrgicos para canulação da traquéia e da veia jugular, e procedeu-se a isquemia hepática por período de 45 minutos ao qual se seguiu outro período de reperfusão durante 2 horas;
- (4) I/R + Licopeno 25mg: ratos foram tratados com licopeno (25 mg de licopeno/Kg/dia) e terminado o período de tratamento os ratos foram sujeitos a procedimentos cirúrgicos para canulação da traquéia e da veia jugular, e procedeu-se a isquemia hepática por período de 45 minutos ao qual se seguiu outro período de reperfusão durante 2 horas;
- (5) Licopeno 25mg: ratos foram tratados com licopeno (25 mg de licopeno/Kg/dia) e terminado o período de tratamento os ratos foram sujeitos a procedimentos cirúrgicos para canulação da traquéia e da veia jugular, como descrito no grupo Sham.

3.2.3.1.2- Procedimento experimental- Isquemia e reperfusão (I/R) hepática

Os animais foram anestesiados com pentobarbital de sódio (Eutasil™, 60 mg/kg i.p., Sanofi Veterinária, Algés, Portugal) no início do trabalho experimental e sempre que se considerou necessário, através de administrações suplementares, garantindo ausência de sensibilidade em todo o período desse protocolo. Todos os animais incluídos nesse protocolo, exceto o grupo controle, foram sujeitos a canulação da traqueia (com o objetivo de facilitar a função respiratória) e a canulação da veia jugular (PP25, I.D. 0.40 mm, Portex) para a administração de soro fisiológico ou anestésico quando necessário.

Nos grupos I/R + licopeno 25mg e I/R, foram efetuados um período de isquemia parcial a $\frac{3}{4}$ do fígado com a duração de 45 minutos, através de uso de microclamp na artéria hepática e veia porta para interromper o fluxo de sangue. A isquemia hepática foi confirmada visualmente por descoloração imediata dos lóbulos hepáticos afetados. O período de reperfusão começou quando se retirou o microclamp vascular, essa fase durou 2 horas e durante esse período pode-se observar a recuperação gradual da coloração dos lóbulos hepáticos sujeitos à isquemia.

Análise bioquímica dos marcadores de disfunção e lesão hepática

Ao final desse protocolo experimental foram colhidos cerca de 5 ml de sangue arterial por punção cardíaca para tubos de colheita com gel SST® e ativador de coagulação (Becton Dickinson Vacutainer Systems Europe®, França). Os animais foram sacrificados recorrendo a uma superdosagem de pentobarbital de sódio. Após livre retração do coágulo, centrifugaram-se as amostras (3000 rpm, 10 minutos, 25°C); o soro obtido por separação do coágulo foi dividido em alíquotas de amostragem para análise e conseqüente caracterização bioquímica da disfunção e lesão hepáticas. As amostras de soro foram enviadas para um laboratório certificado e qualificado de análises clínicas - Clínica Médica e Diagnóstico Dr. Joaquim Chaves (Miraflores, Algés, Portugal).

Para avaliação da lesão hepática induzida pela isquemia-reperfusão hepática, quantificaram-se os níveis séricos das transaminases: alanina aminotransferase (ALT) - descrita como marcador específico da lesão hepatocelular - aspartato aminotransferase (AST) - descrita como marcador não-específico da lesão hepática - lactato desidrogenase (LDH) - descrita como marcador inespecífico da lesão celular, e da gama-glutamyl transferase (γ -GT), um indicador muito sensível mas não específico da doença hepática com atividade aumentada na colestase e na lesão hepatocelular).

Medida de malondialdeído (MDA) no tecido hepático

Os níveis de Malondialdeído (MDA) no tecido hepático foram determinados como indicador de peroxidação lipídica e foi usando o método do ácido tiobarbitúrico.

Ao final do protocolo experimental de I/R as amostras de tecido hepático foram homogeneizadas em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%. Foi retirada uma alíquota de 100 µL do sobrenadante desse homogenato e a ele foram adicionados: 200 µL de SDS 8,1% , 1500 µL de ácido acético 20% (pH 3.5), 1500 µL de ácido tiobarbitúrico a 0,08% e 700 µL de água destilada. Essa mistura foi incubada por 60 minutos a 95°C e centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. A absorbância do sobrenadante foi medida por espectrofotometria (650nm).

3.2.3.2- Lesão térmica

Assim como descrito no item 2.2.3.1 (modelo de I/R hepática), os animais do grupo licopeno foram submetidos ao pré-tratamento com licopeno, disperso em água destilada, os animais do grupo sham e LT receberam apenas o veículo onde foi disperso o licopeno, ou seja, água destilada. A via de administração foi gavagem e o tempo de tratamento 14 dias.

3.2.3.2.1- Grupos experimentais

- (1) Controle: os animais não foram tratados e não sofreram qualquer tipo de procedimento cirúrgico ou Lesão;
- (2) Sham: ratos foram tratados apenas com água destilada e terminado o período de tratamento os ratos foram sujeitos apenas ao procedimento cirúrgico de canulação da traquéia;
- (3) LT: ratos foram tratados com água destilada e terminado o período de tratamento os ratos foram sujeitos a procedimentos cirúrgicos para canulação da traquéia e procedeu-se a lesão térmica;
- (4) LT + Licopeno 25mg: ratos foram tratados com licopeno (25 mg de licopeno/Kg/dia) e terminado o período de tratamento os ratos foram sujeitos a procedimentos cirúrgicos para canulação da traquéia e procedeu-se a lesão térmica;

- (5) Licopeno 25mg: ratos foram tratados com licopeno (25 mg de licopeno/Kg/dia) e terminado o período de tratamento os ratos foram sujeitos a procedimentos cirúrgicos para canulação da traquéia, assim como descrito no grupo Sham.

3.2.3.2.2- Procedimento experimental- Lesão térmica

Os animais foram anestesiados com pentobarbital de sódio (Eutasil™, 60 mg/kg i.p., Sanofi Veterinária, Algés, Portugal) no início do trabalho experimental e ao longo de todos os estágios desse procedimento através de administrações suplementares para garantir ausência de sensibilidade em todo o procedimento. Todos os animais incluídos nesse protocolo foram sujeitos a canulação da traquéia (com o objetivo de facilitar a função respiratória) e tosquiados na região do dorso. Os grupos LT + licopeno 25mg e LT foram submetidos a lesão térmica através da exposição da área dorsal em água à 99° C com duração de 10 segundos. Essa lesão representa a uma lesão térmica equivalente a 30%. Após esse procedimento, aguardou-se intervalo de 6 horas para retirada de amostra de sangue para avaliação clínica das funções de órgãos específicos. Como já citado, durante esse período, a ausência de sensibilidade dos animais foi garantida pela constante manutenção da anestesia.

Análise bioquímica dos marcadores de lesão nos órgãos

Após o intervalo de 6 horas, foram colhidos cerca de 5 mL de sangue arterial por punção cardíaca para tubos de colheita com gel SST® e ativador de coagulação (Becton Dickinson Vacutainer Systems Europe®, França). Os animais foram sacrificados recorrendo a uma superdosagem de pentobarbital de sódio. Assim como descrito no item 2.2.3.1, centrifugaram-se as amostras (3000 rpm, 10 minutos, 25°C); o soro foi dividido em alíquotas de amostragem para análise e conseqüente caracterização bioquímica da lesão de órgãos. As amostras de soro foram enviadas para um laboratório certificado e qualificado de análises clínicas - Clínica Médica e Diagnóstico Dr. Joaquim Chaves (Miraflores, Algés, Portugal).

Para avaliação de lesão em órgãos específicos, foram quantificadas as seguintes enzimas:

- 1-** Avaliação da lesão hepática: transaminases: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST);
- 2-** Avaliação da lesão renal: creatinina, uréia;
- 3-** Avaliação da lesão pancreática: amilase.

3.3- Procedência das substâncias químicas

Licopeno (Redivivo™ 10% WS) - DSM Produtos nutricionais (São Paulo-SP, Brasil).

L-arginina N^ω-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), Uretano - Sigma - Aldrich Química SA (São Paulo-SP, Brasil).

Pentobarbital sodium (Eutasil) - Sanofi Veterinária (Miraflores, Algés, Portugal).

λ-Carragenina - Sigma-Aldrich Química SA (Sintra, Portugal).

3.4- Análise estatística

Para efeito de tratamento estatístico, os dados – apresentados na forma de média ± erro padrão da média (EPM), foram estudados através de uma análise de variância ANOVA de uma entrada, seguida de um pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Protocolo 1- Modelo de inibição crônica da síntese de óxido nítrico por L-NAME

4.1.1- Avaliação do peso corporal

Na avaliação do peso corporal observou-se que houve uma elevação progressiva esperada do aumento de peso ao longo das semanas de tratamento em todos os grupos tratados (Figura 6)

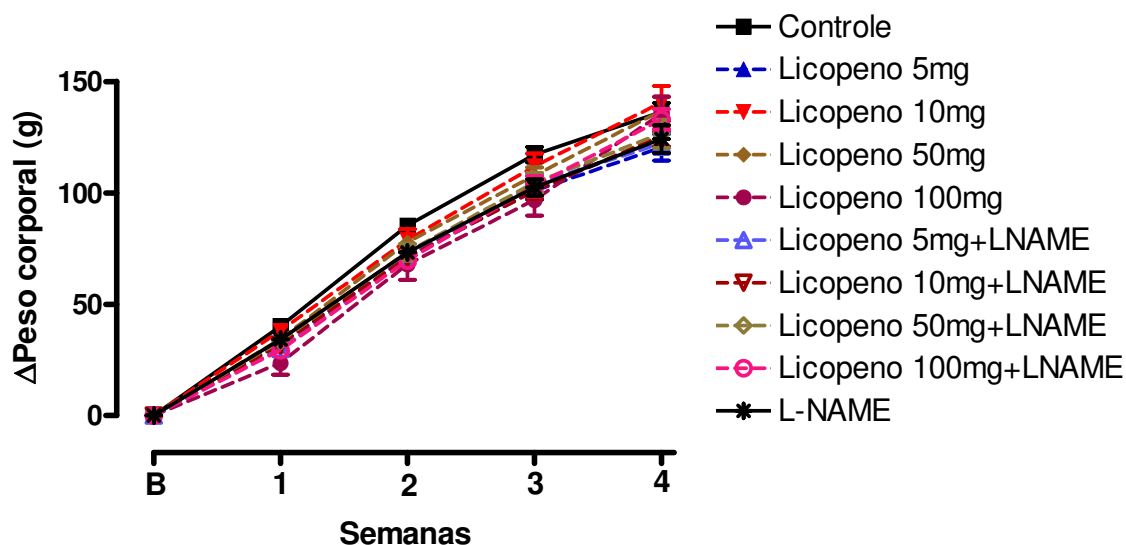


Figura 6- Apresentação gráfica da evolução do peso corporal nos grupos: Controle (n=10), Lycopeno 5mg (n=10), Lycopeno 10mg (n=10), Lycopeno 50mg (n=10), licopeno 100 mg (n=10), Lycopeno 5mg + L-NAME (n=10), Lycopeno 10mg + L-NAME (n=10), Lycopeno 50mg + L-NAME (n=10), licopeno 100 mg + L-NAME (n=10) e L-NAME (n=10) durante as 4 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos em média das medidas semanais $\pm$ EPM.

4.1.2- Avaliação da pressão arterial média (PAM)

A administração crônica de L-NAME induziu ao aumento significativo da pressão arterial média (PAM, mmHg) nos ratos dos grupos L-NAME ($152,9 \pm 7,9$ mmHg), Lycopeno 5mg + L-NAME ($146,8 \pm 5,4$ mmHg), Lycopeno 10mg + L-NAME ($158,9 \pm 4,6$ mmHg), Lycopeno 50mg + L-NAME ($144,8 \pm 3,7$ mmHg) e Lycopeno 100mg + L-NAME ($144,7 \pm 7,9$ mmHg) quando comparado ao grupo Controle ($111,1 \pm 7,5$ mmHg) (Figura 8).

A PAM dos animais dos grupos Licopeno 5mg ($116,6 \pm 4,2$ mmHg), Licopeno 10mg ($119,5 \pm 3,4$ mmHg), Licopeno 50mg ($107,2 \pm 4,3$ mmHg) e Licopeno 100mg ($117,4 \pm 2,7$ mmHg), não apresentaram diferenças significativamente quando comparados ao grupo Controle (Figura 7).

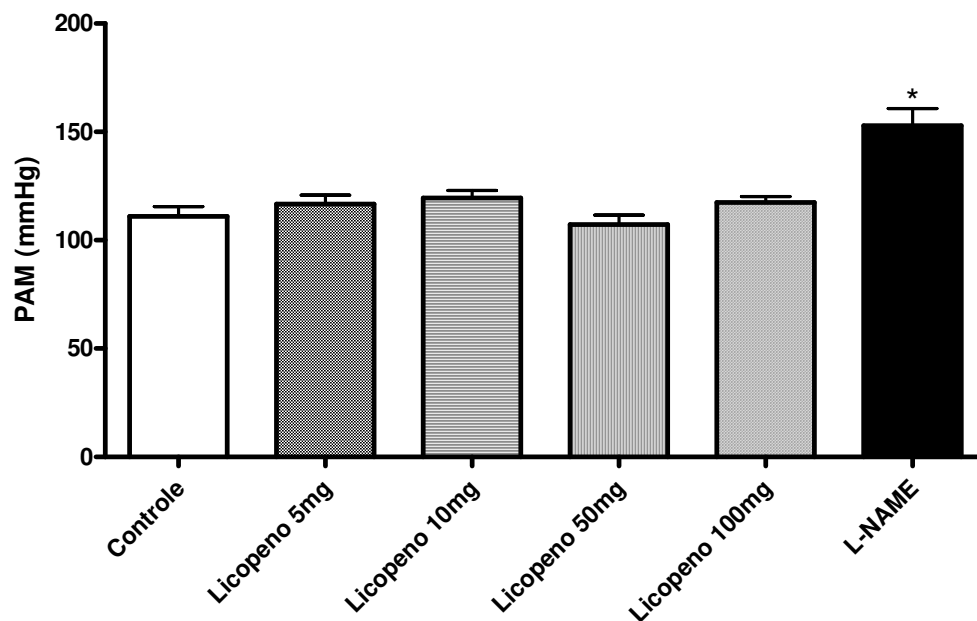


Figura 7- Valores de pressão arterial média (PAM) obtida por canulação da artéria carótida após 4 semanas de tratamento nos grupos Controle (n=9), Licopeno 5mg (n=9), Licopeno 10mg (n=8), Licopeno 50mg (n=9), Licopeno 100mg (n=8) e L-NAME (n=8). Os valores estão expressos em milímetros de mercúrio (mmHg), sob a forma de média $\pm$ EPM. *P < 0,05 vs. Controle

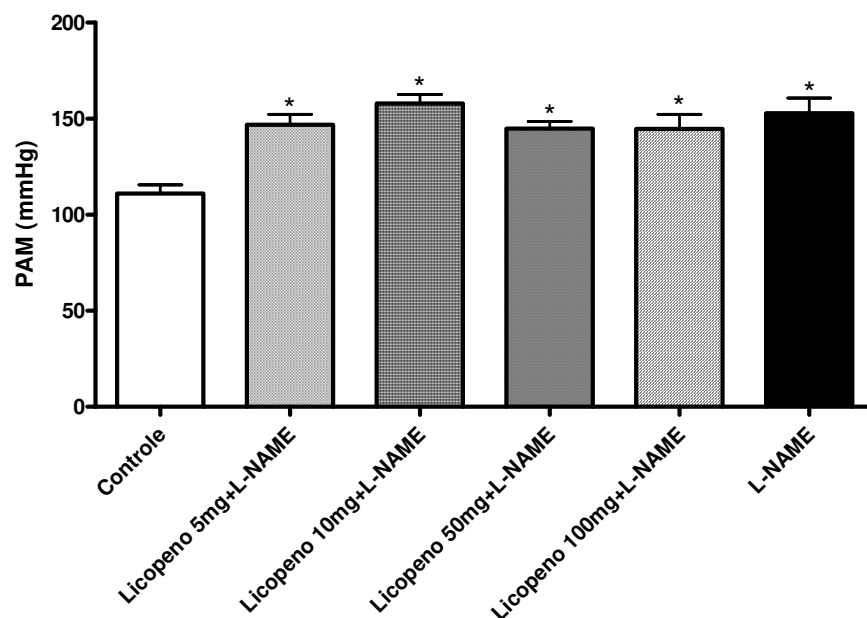


Figura 8- Valores de pressão arterial média (PAM) obtida por canulação da artéria carótida após 4 semanas de tratamento nos grupos Controle (n=9), Licopeno 5mg + L-NAME (n=9), Licopeno 10mg + L-NAME (n=9), Licopeno 50mg + L-NAME (n=9), Licopeno 100mg + L-NAME (n=9) e L-NAME (n=8). Os valores estão expressos em milímetros de mercúrio (mmHg), sob a forma de média $\pm$ EPM. *P < 0,05 vs. Controle

4.1.3- Fluxo Aórtico

A administração crônica de L-NAME causou redução significativa do DC nos ratos dos grupos L-NAME ($21,3 \pm 1,6$ mL/min), Licopeno 5mg + L-NAME ($15,6 \pm 1,8$ mL/min), Licopeno 10mg + L-NAME ($24,1 \pm 3,3$ mL/min), Licopeno 50mg + L-NAME ($18,8 \pm 1,8$ mL/min) e Licopeno 100mg + L-NAME ($18,1 \pm 2,1$ mL/min) quando comparados com o grupo Controle ($48,3 \pm 4,5$ mL/min). A administração concomitante de L-NAME e licopeno nas diversas doses, não aumentaram o DC quando comparado ao grupo de animais que recebeu apenas L-NAME isoladamente ($21,3 \pm 1,6$ mL/min) (Figura 10). O DC dos animais que receberam apenas licopeno não diferiu do grupo Controle (Figura 9).

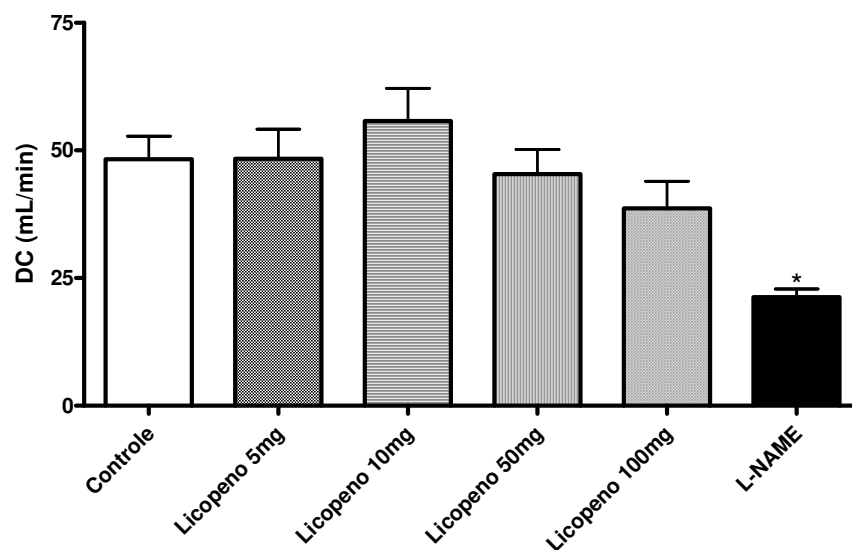


Figura 9- Débito cardíaco (DC) após 4 semanas de tratamento nos grupos Controle (n=9), Licopeno 5mg (n=9), Licopeno 10mg (n=9), Licopeno 50mg (n=9), Licopeno 100mg (n=8) e L-NAME (n=8). Os valores estão expressos em mililitros por minuto (mL/min), sob forma de média $\pm$ EPM. *P < 0,05 vs. Controle.

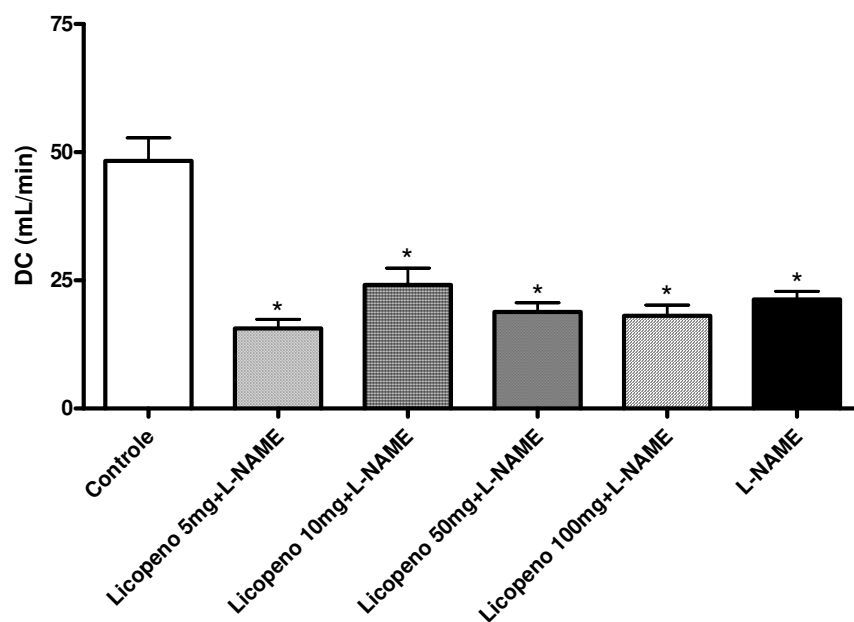


Figura 10- Débito cardíaco (DC) após 4 semanas de tratamento nos grupos Controle (n=9), Licopeno 5mg + L-NAME (n=9), Licopeno 10mg + L-NAME (n=9), Licopeno 50mg + L-NAME (n=9), Licopeno 100mg + L-NAME (n=9) e L-NAME (n=8). Os valores estão expressos em mililitros por minuto (mL/min), sob forma de média $\pm$ EPM. *P < 0,05 vs. Controle.

4.1.4- Resistência Vascular Periférica Total (RVPT)

Os resultados demonstram que houve um significativo aumento na RVPT (mmHg/mL/min) nos grupos L-NAME (5.5 ± 0.5), Licopeno 5mg + L-NAME (7.3 ± 0.8), Licopeno 10mg + L-NAME (5.7 ± 0.9), Licopeno 50mg + L-NAME (6.1 ± 0.7) e Licopeno 100mg + L-NAME (6.7 ± 0.7) quando comparados ao grupo Controle (1.3 ± 0.2) (Figura 12). Nos animais que receberam apenas licopeno, Licopeno 5mg (1.9 ± 0.2), Licopeno 10mg (1.7 ± 0.2), Licopeno 50mg (2.0 ± 0.2) e Licopeno 100mg (2.6 ± 0.3), não verificou-se diferença significativa nos valores de RVPT quando comparados ao grupo Controle (Figura 11).

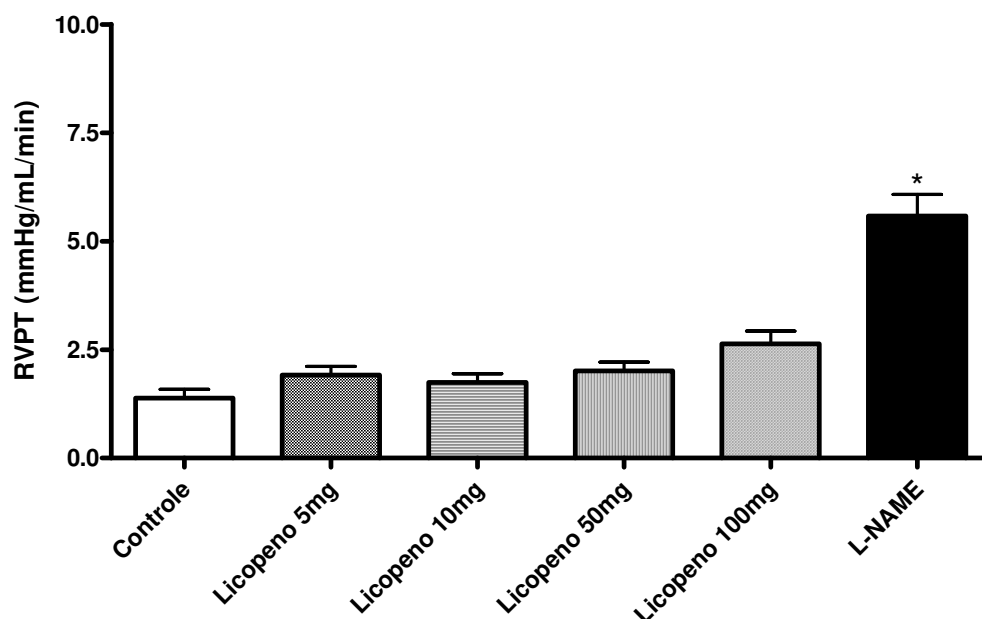


Figura 11- Avaliação indireta da Resistência Vascular Periférica Total (RVPT) após 4 semanas de tratamento nos grupos Controle (n=9), Licopeno 5mg (n=9), Licopeno 10mg (n=9), Licopeno 50mg (n=9), Licopeno 100mg (n=8) e L-NAME (n=8). Os valores estão expressos em milímetros de mercúrio por mililitros por minuto (mmHg/mL/min), sob forma de média $\pm$ EPM. *P < 0,05 vs. Controle.

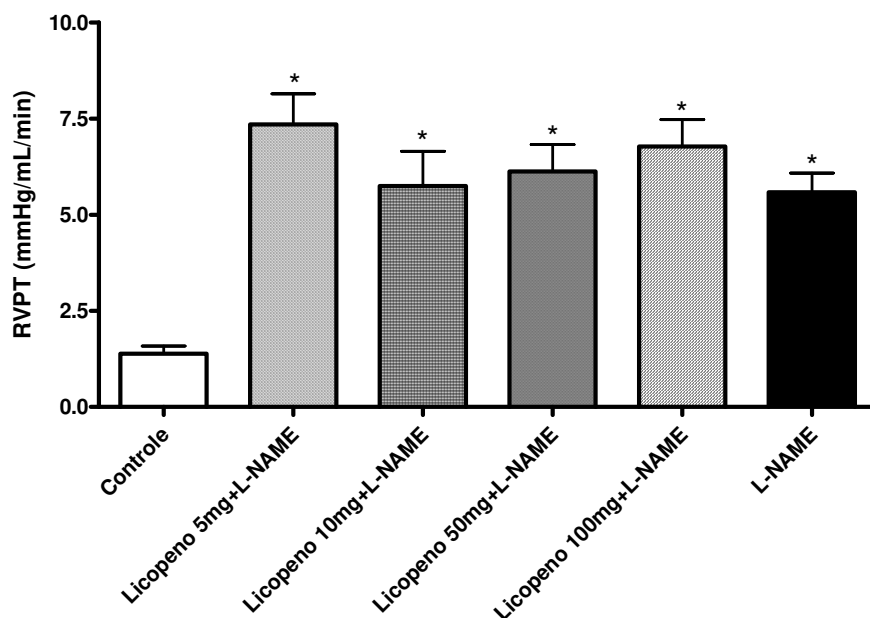


Figura 12- Avaliação indireta da Resistência Vascular Periférica Total (RVPT) após 4 semanas de tratamento dos grupos Controle (n=9), Licopeno 5mg + L-NAME (n=9), Licopeno 10mg + L-NAME (n=9), Licopeno 50mg + L-NAME (n=9), Licopeno 100mg + L-NAME (n=9) e L-NAME (n=8). Os valores estão expressos em milímetros de mercúrio por mililitros por minuto (mmHg/mL/min), sob forma de média $\pm$ EPM. *P < 0,05 vs. Controle.

4.2- Protocolo 2- Modelos de inflamação aguda

4.2.1- Edema da pata

De uma maneira geral, observamos que nos dois tratamentos (agudo e crônico) usados para esse estudo, a administração intraplantar de carragenina conduziu a um aumento no volume da pata de forma tempo-dependente (Figura 13 e 17). Esse aumento no volume da pata foi observado 3 horas após a administração da carragenina e o valor máximo do aumento do volume da pata obtido foi 6 horas após a administração da carragenina (Figura 13). Entretanto, o volume do edema da pata induzido pela carragenina foi reduzido com a administração de licopeno, de forma dose dependente (Figura 13).

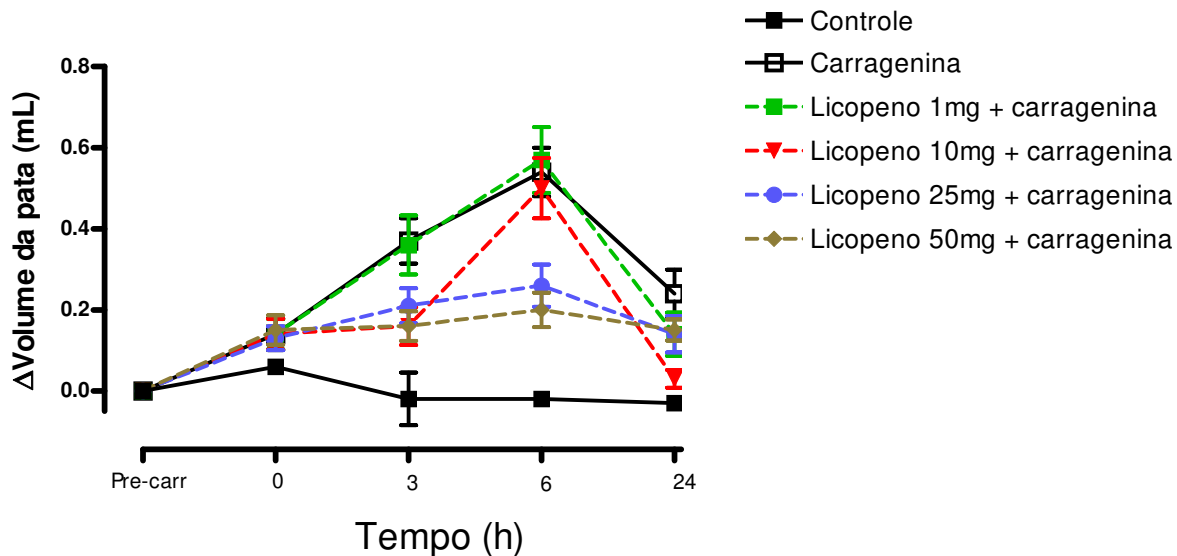


Figura 13- Avaliação da diferença da variação do volume da pata em função do tempo no tratamento agudo com licopeno. Grupos Controle (n=3), Carragenina (n=8), Licopeno 1mg (n=7), Licopeno 10mg (n=7), Licopeno 25mg (n=7) e Licopeno 50mg (n=8) que compõem o tratamento agudo. Os resultados estão expressos em mililitros (mL) em função do tempo em horas (h) (média $\pm$ EPM)

Outro ponto de intersecção entre os dois tratamentos é a formação do edema da pata induzido pela administração da carragenina quando comparados aos grupos Controle, em que foi administrado suplantar apenas soro fisiológico. No tratamento agudo nota-se o aumento do volume da pata em porcentagem para o grupo Carragenina ($32,0 \pm 5,2$) comparado ao grupo Controle ($-1,7 \pm 6,0$) após 3 horas à indução da formação do edema (Figura 14) e essa diferença foi maior após 6 horas da administração, onde o grupo Carragenina apresentou uma porcentagem maior de aumento do volume da pata ($46,9 \pm 7,6$) comparado ao grupo controle ($-1,89 \pm 0,9$) (Figura 15).

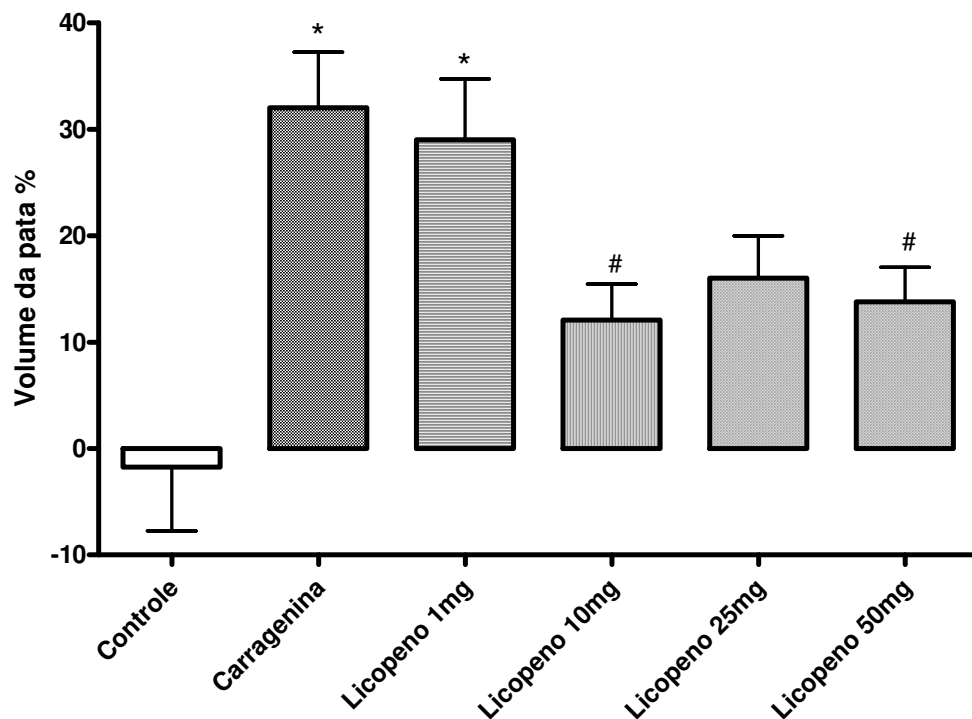


Figura 14- Efeito do tratamento agudo com licopeno no tempo de 3 horas após desenvolvimento do edema da pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina. Grupos Controle (n=3), Carragenina (n=7), Licopeno 1mg (n=7), Licopeno 10mg (n=7), Licopeno 25mg (n=7), Licopeno 50mg (n=8) no desenvolvimento do edema da pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina. Resultados estão apresentados em porcentagem de aumento do volume da pata no tempo de 3 horas após a administração da carragenina e estão expressos como Média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ vs Controle, # $P < 0,05$ vs Carragenina

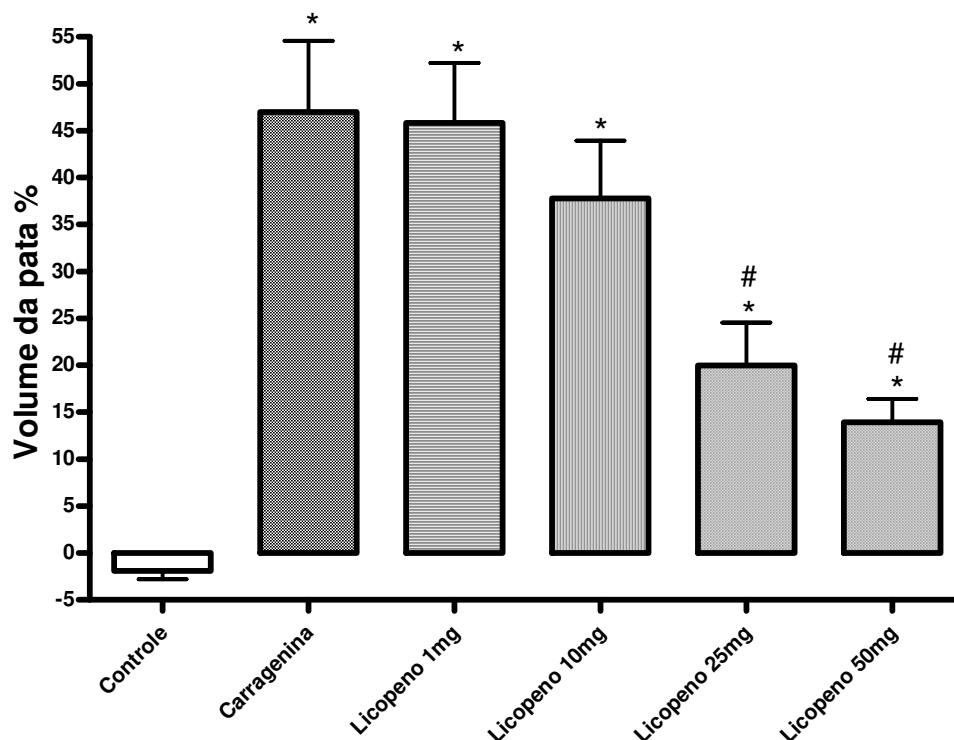


Figura 15- Efeito do tratamento agudo com licopeno no tempo de 6 horas após desenvolvimento do edema da pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina. Grupos Controle (n=3), Carragenina (n=7), Licopeno 1mg (n=7), Licopeno 10mg (n=7), Licopeno 25mg (n=7), Licopeno 50mg (n=8) no desenvolvimento do edema da pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina. Resultados estão apresentados em porcentagem de aumento do volume da pata no tempo de 6 horas após a administração da carragenina e estão expressos como Média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ vs Controle, # $P < 0,05$ vs Carragenina

Esse comportamento se manteve para os grupos do tratamento crônico, após 3 horas da administração da carragenina observa-se o aumento do volume da pata em porcentagem para o grupo Carragenina ($26,7 \pm 2,7$) comparado ao grupo Controle ($0,6 \pm 3,4$) (Figura 18) e após 6 horas da administração, o a intensidade do edema também foi maior, o grupo Carragenina apresentou uma porcentagem maior de aumento do volume da pata ($67,8 \pm 4,7$) comparado ao grupo Controle ($1,26 \pm 0,6$) (Figura 19).

Especificamente ao que se refere ao tratamento agudo, após 3 horas da indução de edema de pata pela carragenina observou-se uma redução da porcentagem do aumento do volume da pata apenas nos grupos Licopeno 10mg ($12,1 \pm 3,4$) e Licopeno 50mg ($13,8 \pm 3,2$) quando comparados ao grupo Carragenina ($32,0 \pm 5,2$) (Figura 14). Entretanto, após 6 horas da administração de carragenina houve um menor aumento da formação do edema da pata em porcentagem nos grupos Licopeno 25mg ($19,9 \pm 7,6$) e Licopeno 50mg ($13,9 \pm 2,5$) quando comparados ao grupo Carragenina ($47,0 \pm 7,6$) (Figura 15). Em adição a essa notificação, a redução do aumento do volume da pata observados nesses dois grupos, Licopeno 25mg e Licopeno 50mg, foi da mesma magnitude de um composto usado como referência de atividade antiinflamatória Indometacina (10mg/Kg, i.p.) ($13,1 \pm 4,7$) (Figura 16).

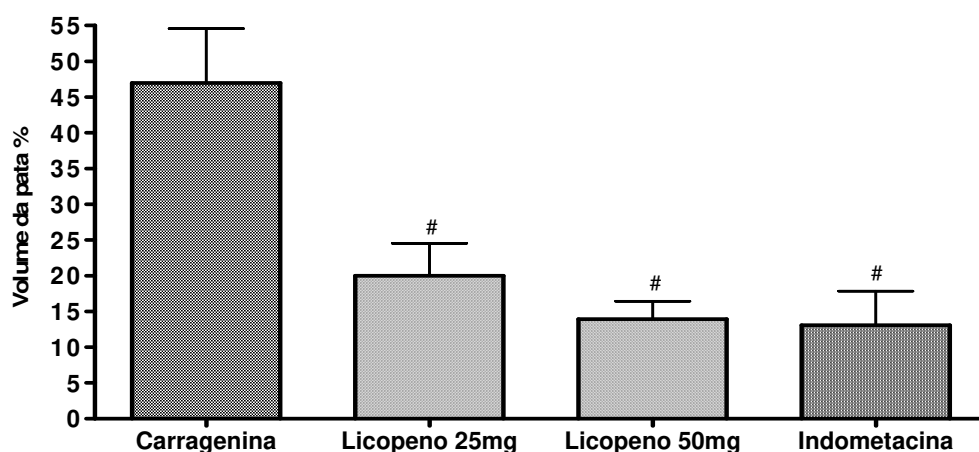


Figura 16- Comparação do efeito do tratamento agudo com licopeno 25mg (n=7) e Licopeno 50 mg (n=8) com o efeito da Indometacina (10 mg/kg ip; n=8) no desenvolvimento do edema da pata induzido pela administração intraplantar de carragenina. Resultados estão apresentados em porcentagem de aumento do volume da pata no tempo de 6 horas após a administração da carragenina e estão expressos como Média ±EPM. # $P < 0,05$ vs Carragenina

Nos grupos referentes ao tratamento crônico, após 14 dias de tratamento não se observou uma redução da porcentagem do aumento do volume da pata, após 3 horas da indução de edema de pata pela carragenina em ambos os grupos tratados com licopeno, Licopeno 25mg ($24,3 \pm 4,3$) e Licopeno 50mg ($31,2 \pm 4,9$) quando comparados ao grupo Carragenina ($26,7 \pm 2,7$) (Figura 18). Entretanto, após 6 horas da administração desse estímulo inflamatório pode-se observar a redução em porcentagem, do aumento do volume da pata nos grupos Licopeno 25mg ($43,2 \pm 5,7$) e Licopeno 50mg ($39,9 \pm 4,8$) quando comparados ao grupo Carragenina ($67,8 \pm 4,7$) (Figura 19).

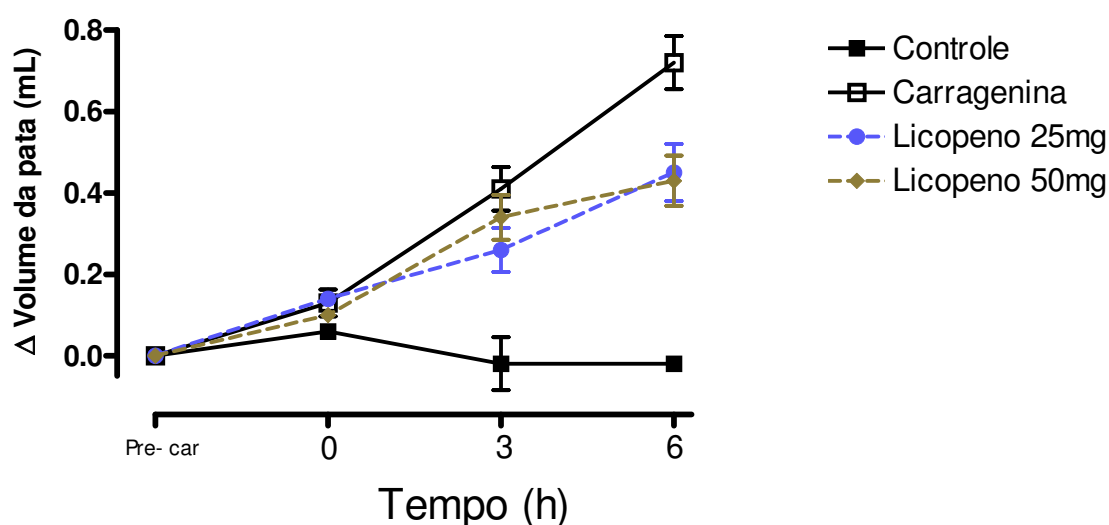


Figura 17- Avaliação da diferença variação do volume da pata em função do tempo no tratamento crônico com licopeno. Grupos Controle (n=3), Carragenina (n=11), Licopeno 25mg (n=14) e Licopeno 50mg (n=14). Os resultados estão expressos em mililitros (mL) em função do tempo em horas (h) (média $\pm$ EPM)

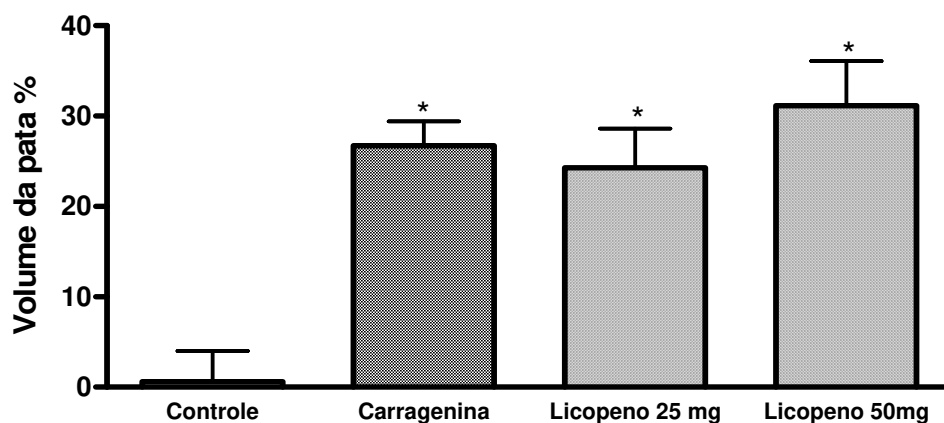


Figura 18- Efeito do tratamento crônico com licopeno durante 14 dias no tempo de 3 horas após desenvolvimento do edema da pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina. Grupos Controle (n=3), Carragenina (n=11), Licopeno 25mg (n=14), Licopeno 50mg (n=14) no desenvolvimento do edema da pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina. Resultados estão apresentados em porcentagem de aumento do volume da pata no tempo de 3 horas após a administração da carragenina e estão expressos como Média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ vs Controle

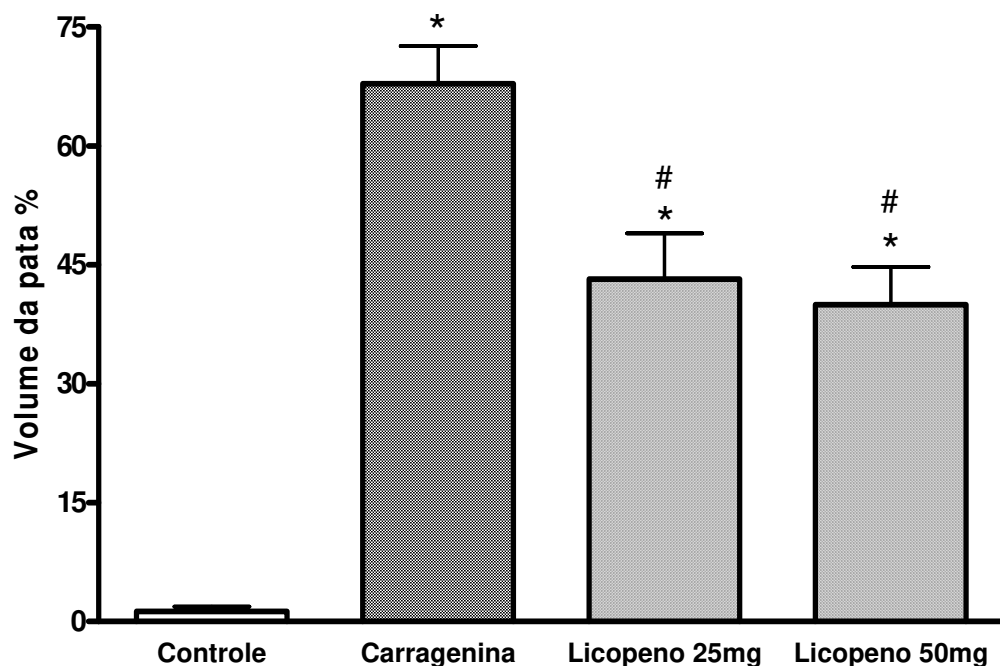


Figura 19- Efeito do tratamento crônico com licopeno durante 14 dias no tempo de 6 horas após desenvolvimento do edema da pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina. Grupos Controle (n=3), Carragenina (n=11), Licopeno 25mg (n=14), Licopeno 50mg (n=14). Resultados estão apresentados em porcentagem de aumento do volume da pata no tempo de 6 horas após a administração da carragenina e estão expressos como Média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ vs Controle, # $P < 0,05$ vs Carragenina

4.2.2- Modelo de inflamação aguda sistêmica: Isquemia e perfusão hepática e lesão térmica

4.2.2.1- Isquemia e perfusão hepática

De acordo com os resultados obtidos, o procedimento cirúrgico do grupo Sham não resultou em alterações significativas nos níveis séricos de ALT ($50,8 \pm 3,7$) (Figura 20A), AST ($157,4 \pm 11,2$) (Figura 20B), LDH ($1011,4 \pm 165,6$) (Figura 21A), e γ -GT ($0,3 \pm 0,06$) (Figura 21B), quando comparados com os valores obtidos para o grupo Controle que apresentou valores de ALT ($30,8 \pm 1,7$), AST ($118,7 \pm 15,1$) (Figura 20 A e B),

LDH ($503,4 \pm 105,7$), e γ -GT ($0,2 \pm 0,06$) (Figura 21 A e B). Entretanto, quando se procedeu a metodologia de isquemia-reperfusão hepática (I/R) observou-se o aumento significativo nos níveis séricos das enzimas marcadores de lesão ALT ($1675,8 \pm 78,9$), AST ($1146,5 \pm 138,1$) (Figura 20 A e B), LDH ($5209,6 \pm 589,4$), e γ -GT ($1,1 \pm 0,08$) (Figura 21 A e B), quando comparado com o grupo Sham com valores ALT ($50,8 \pm 3,7$), AST ($157,4 \pm 11,2$) (Figura 20 A e B), LDH ($1011,4 \pm 165,6$) e γ -GT ($0,3 \pm 0,06$) (Figura 21 A e B). Esses dados denotam o desenvolvimento de lesão hepática.

Os animais sujeitos ao pré-tratamento com o Licopeno 25mg e submetidos ao procedimento de I/R hepática, apresentaram uma redução estatisticamente significativa nos níveis séricos de ALT ($915,8 \pm 134,9$), AST ($758,1 \pm 101,7$) e γ -GT ($0,3 \pm 0,08$) quando comparados aos grupos I/R hepática (ALT- $1675,8 \pm 78,9$; AST- $1146,5 \pm 138,1$; e γ -GT- $1,1 \pm 0,08$). Entretanto, o nível de LDH ($4541,3 \pm 774,3$) se manteve elevado quando comparado ao grupo I/R hepática (LDH - $5209,6 \pm 589,4$).

O Licopeno 25mg quando administrado pelo mesmo período de tratamento e não submetido ao processo I/R hepática não apresentou qualquer efeito nos níveis séricos de ALT ($23,3 \pm 1,36$), AST ($113,0 \pm 9,5$) e LDH ($928,5 \pm 123,6$) quando comparados aos grupos Controle e Sham.

Quanto aos valores de MDA o pré-tratamento com Licopeno resultou em redução nos níveis de MDA no tecido hepático quando comparado ao tecido hepático do grupo submetido somente a I/R (Figura 22).

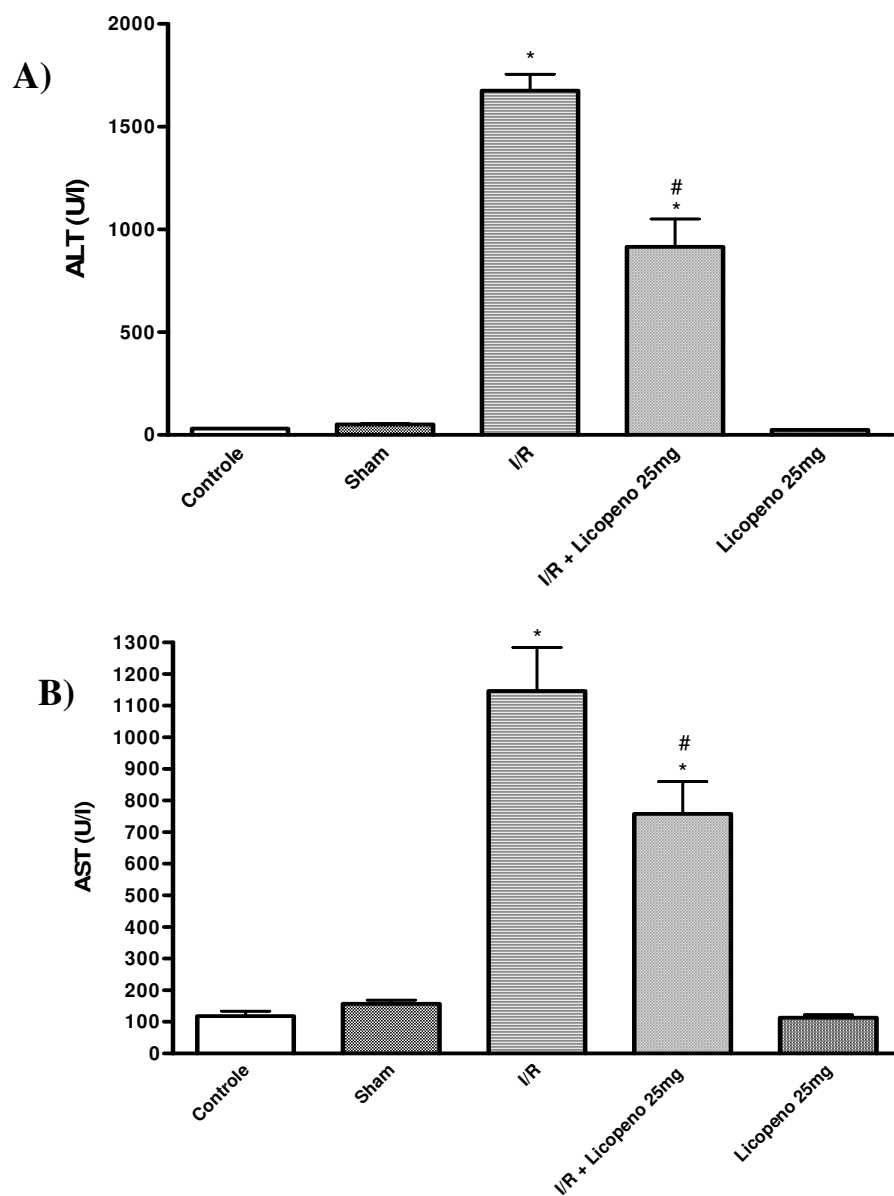


Figura 20- Avaliação do efeito do tratamento crônico com o Licopeno (25mg/Kg) nos níveis séricos de em (A) alanina aminotransferase (ALT) e em (B) aspartato aminotransferase (AST) após o procedimento de Isquemia e reperfusão (I/R) hepática. Grupos Controle (n=10), Sham (n=11), I/R (n=8), I/R+Licopeno 25mg (n=7) e Licopeno 25mg (n=10). Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. *P<0,05 vs Sham; # P<0,05 vs I/R

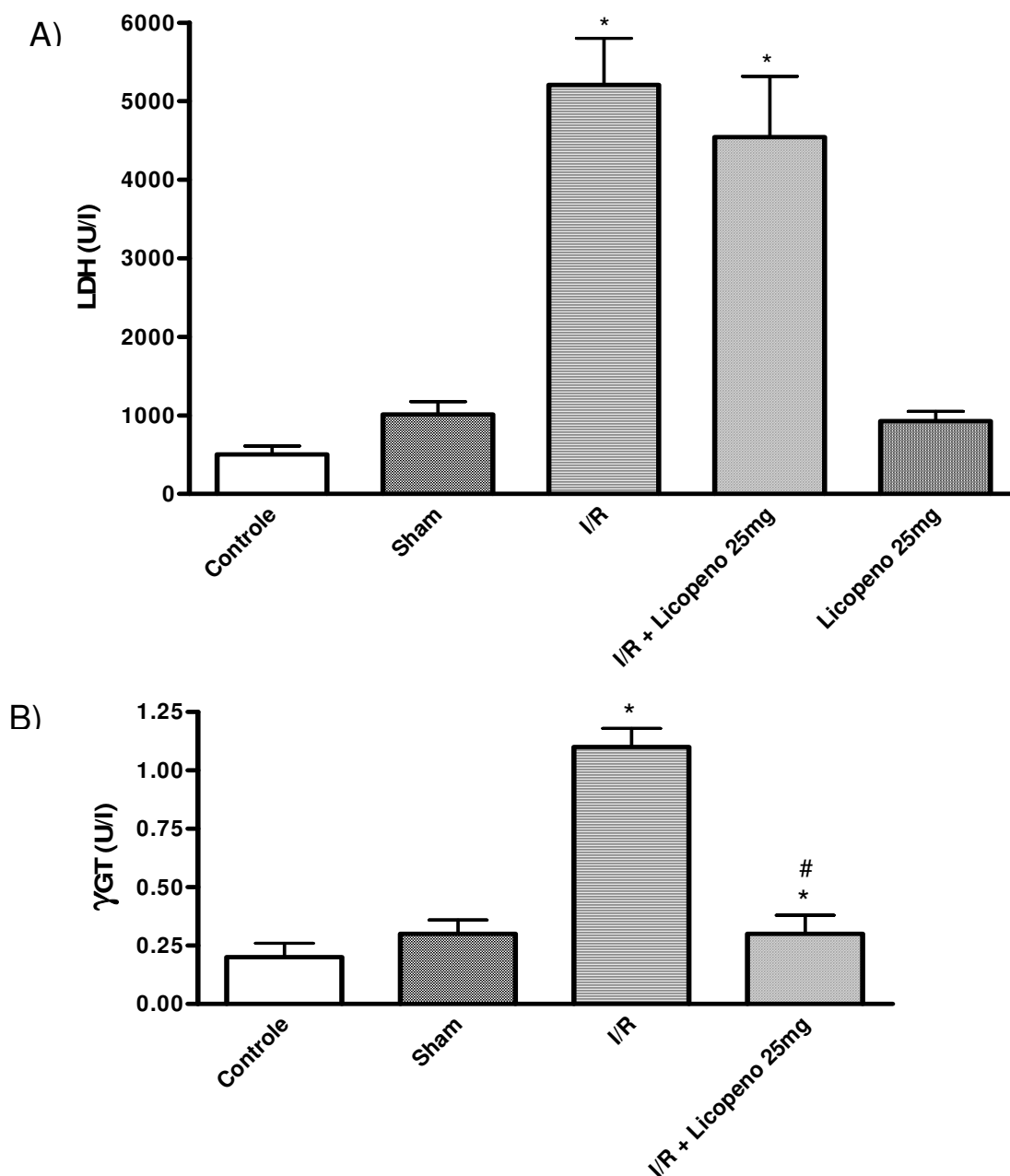


Figura 21- Avaliação do efeito do tratamento crônico com o Licopeno (25mg/Kg) nos níveis séricos de em (A) lactato desidrogenase (LDH) e em (B) gama-glutamil transferase (γ - GT) após o procedimento de Isquemia e reperusão (I/R) hepática. Em (A) os grupos são: Controle (n=10), Sham (n=11), I/R (n=8), I/R+Licopeno 25mg (n=7) e Licopeno 25mg (n=10) e em (B) os grupos são Controle (n=10), Sham (n=11), I/R (n=8), I/R+Licopeno 25mg (n=7). Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. *P<0,05 vs Sham; # P<0,05 vs I/R

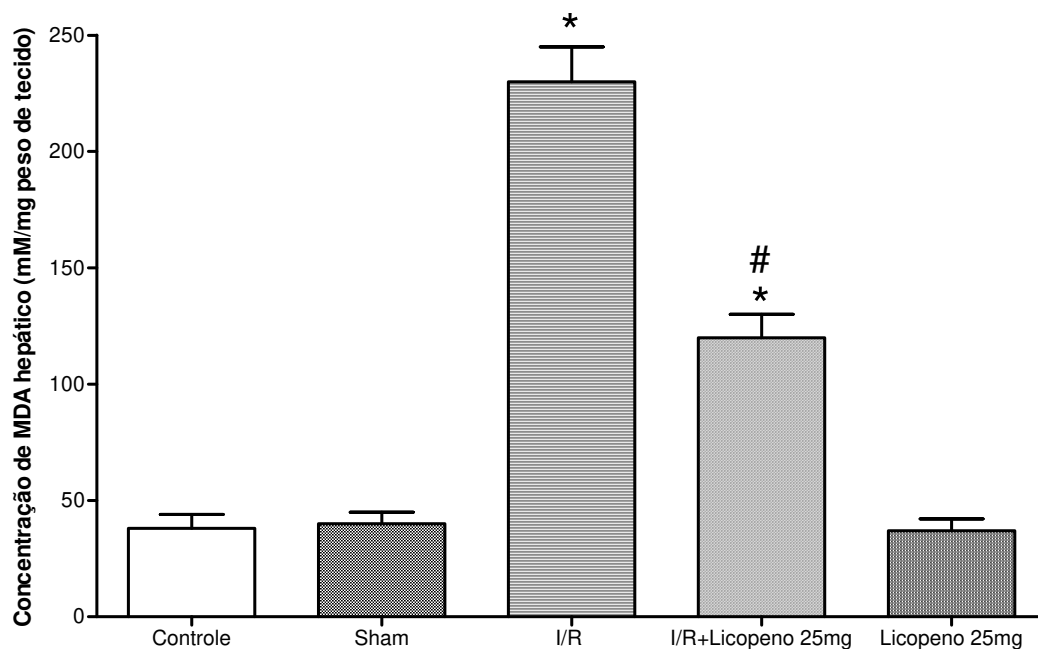


Figura 22- Avaliação do efeito do tratamento crônico com o Licopeno (25mg/Kg) nos níveis teciduais de malondialdeído (MDA) após o procedimento de Isquemia e reperfusão (I/R) hepática. Grupos Controle (n=4), Sham (n=9), I/R (n=7), I/R+Licopeno 25mg (n=7), Licopeno 25mg (n=4). Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ vs Sham; # $P < 0,05$ vs I/R

4.2.2.2- Lesão térmica

Nessa metodologia, também se observa que no grupo Sham não há alterações significativas nos níveis séricos de ALT ($40,3 \pm 6,7$) (Figura 23A), AST ($147,6 \pm 28,2$) (Figura 23B), Uréia ($36,7 \pm 2,3$) (Figura 24A), Creatinina ($0,3 \pm 0,04$) (Figura 24B) e Amilase ($1913,4 \pm 102,6$) (Figura 25) quando comparados aos valores do grupo Controle com valores de ALT ($30,8 \pm 1,7$), AST ($118,7 \pm 15,1$), (Figura 23 A e B), Uréia ($33,4 \pm 0,8$), Creatinina ($0,2 \pm 0,01$) (Figura 24 A e B) e Amilase ($1932,4 \pm 97,1$) (Figura 25).

Entretanto, com a Lesão Térmica (LT) observou-se o aumento significativo nos níveis séricos das enzimas estudadas, ALT ($262,8 \pm 32,9$), AST ($786,5 \pm 59,9$), (Figura 23 A e B), Uréia ($112,1 \pm 3,4$), Creatinina ($1,7 \pm 0,1$) (Figura 24A e B), Amilase ($2431,4 \pm 90,5$) (Figura 25) quando comparado com o grupo Sham.

Os animais que foram submetidos ao pré-tratamento com o Licopeno 25mg e posteriormente submetidos à Lesão Térmica (LT), apresentaram uma redução estatisticamente significativa apenas nos níveis séricos de ALT ($182,2 \pm 18,2$). Os demais parâmetros como AST ($693,2 \pm 80,8$), Uréia ($109,1 \pm 4,0$), Creatinina ($1,5 \pm 0,1$) e Amilase ($3188,6 \pm 156,7$) não apresentaram redução nos níveis séricos desses marcadores.

O Licopeno 25mg quando administrado pelo mesmo período de tratamento e não submetido ao processo LT não apresentou qualquer efeito nos níveis séricos de ALT ($23,3 \pm 1,36$), AST ($113,0 \pm 9,5$), Uréia ($27,9 \pm 1,0$), Creatinina ($0,24 \pm 0,01$) e Amilase ($1916,8 \pm 115,9$) quando comparados aos grupos Controle e Sham.

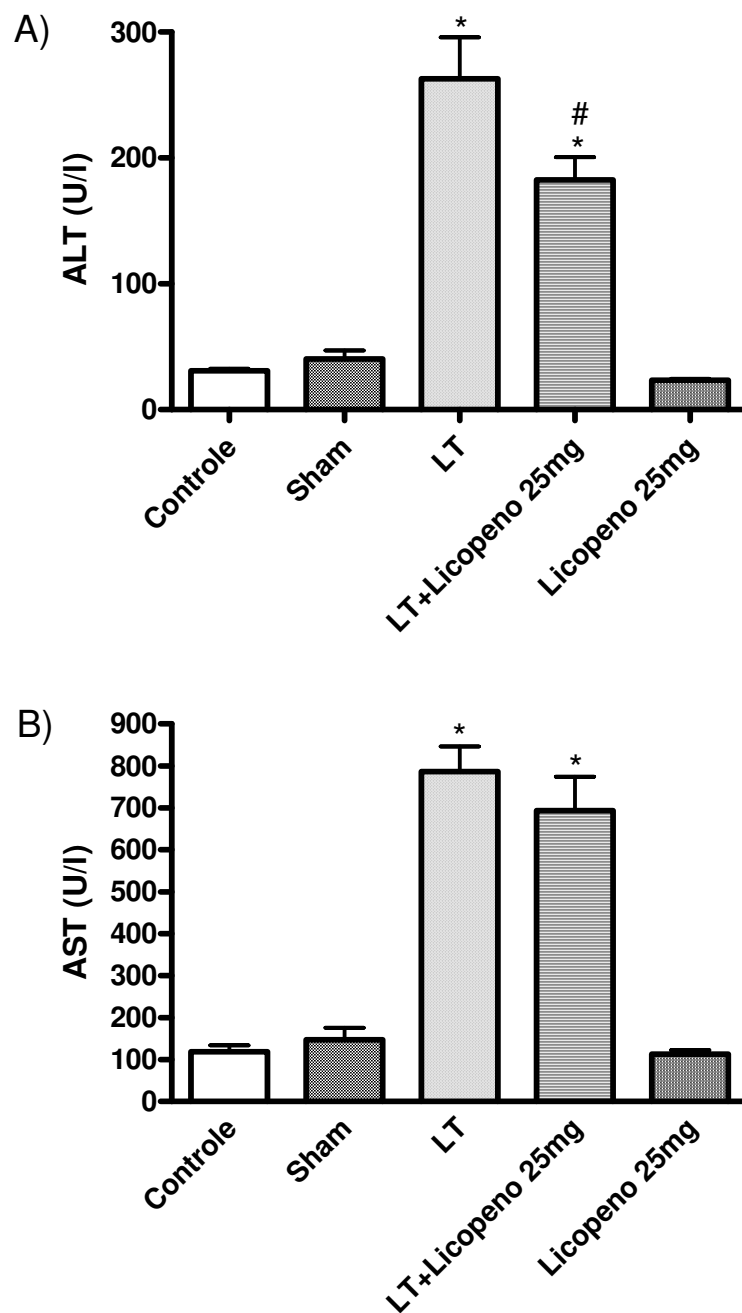


Figura 23- Avaliação do efeito do tratamento crônico com o Licopeno (25mg/Kg) nos níveis séricos de em (A) alanina aminotransferase (ALT) e em (B) aspartato aminotransferase (AST) na Lesão Térmica (LT). Grupos Controle (n=10), Sham (n=9), LT (n=12), LT+Licopeno 25mg (n=8) e Licopeno 25mg (n=10). Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. *P<0,05 vs Sham; # P<0,05 vs LT

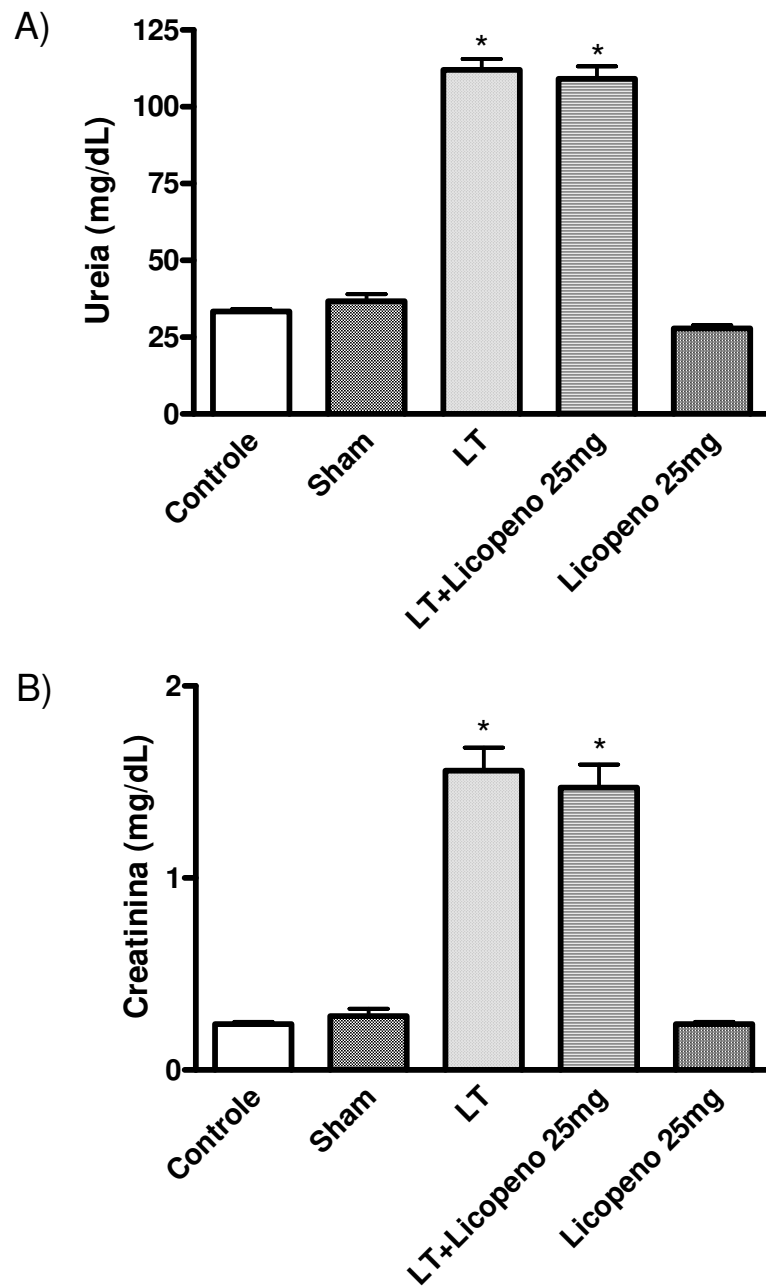


Figura 24- Avaliação do efeito do tratamento crônico com o Licopeno (25mg/Kg) nos níveis séricos de em (A) Ureia e em (B) Creatinina após o procedimento de Lesão térmica (LT). Grupos Controle (n=10), Sham (n=9), LT (n=12), LT+Licopeno 25mg (n=8) e Licopeno 25mg (n=10). Os resultados estão expressos em média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ vs Sham

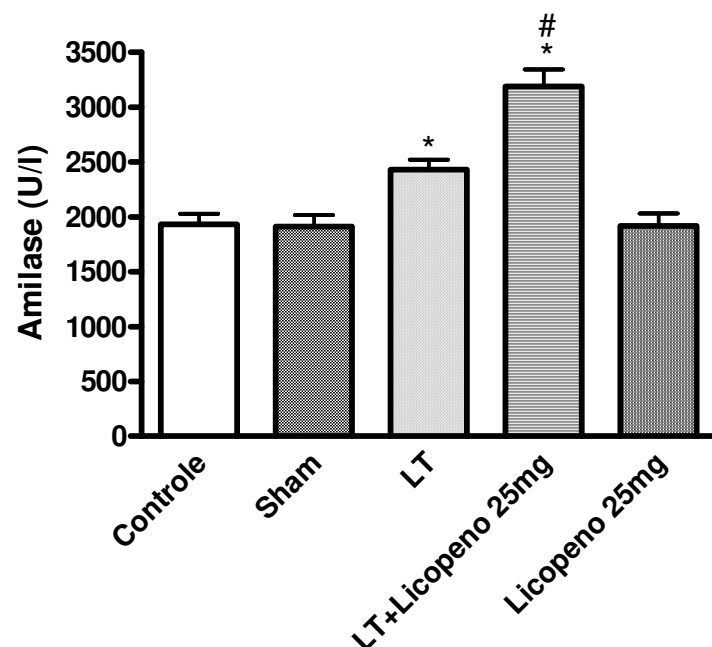


Figura 25- Avaliação do efeito do tratamento crônico com o Licopeno (25mg/Kg) nos níveis séricos de Amilase após o procedimento de Lesão térmica (LT). Grupos Controle (n=10), Sham (n=9), LT (n=12), LT+Licopeno 25mg (n=8) e Licopeno 25mg (n=10) Os resultados estão expressos em média ± EPM. *P<0,05 vs Sham; # P<0,05 vs LT

5- DISCUSSÃO

Pesquisas têm sido feitas para demonstrar que os alimentos funcionais desempenham um papel importante na manutenção da saúde e na prevenção de doenças crônicas como câncer e aterosclerose (Lopez-Varela *et al.*, 2002). Nesse contexto, estudos epidemiológicos associam o aumento do consumo de tomate ou derivados na redução de risco de doenças cardiovasculares e câncer (Agarwal & Rao, 2000; Arab & Steck, 2000). Tomate é um vegetal muito consumido em todo o mundo e é fonte de importantes nutrientes para o organismo como potássio, vitaminas A, C e E. Além de conter carotenóides (luteína, licopeno e β -caroteno) e flavonóides (Canene-Adams *et al.*, 2005). Mas os efeitos benéficos do aumento no consumo de tomate ou seus derivados é atribuído principalmente pela ação do licopeno, carotenóide que apresenta ação antioxidante como a sua principal atividade biológica (Clinton, 1998; Agarwal & Rao, 2000; Arab & Steck, 2000; Devaraj *et al.*, 2008).

Pelo fato de espécies reativas estarem envolvidas em processos fisiopatológicos de diversas doenças, o conhecimento da ação de substâncias com propriedade antioxidante e a busca de seu possível efeito benéfico na saúde se tornou essencial não somente para melhor conhecer a participação dessas espécies reativas na patogênese das doenças, mas também buscar a redução de danos provocados quando há excesso na produção de espécies reativas.

Estudo clínico usando cronicamente cápsulas contendo 250 mg de extrato de tomate (equivalente a 15mg de licopeno) durante 8 semanas em pacientes com hipertensão grau 1 mostrou redução na pressão arterial a partir da 6ª semana de tratamento com a cápsula de extrato de tomate por sua ação antioxidante ao demonstrar redução de produtos da oxidação do LDL (Engelhard *et al.*, 2005) por essa razão estudamos a possibilidade do tratamento crônico com licopeno poderia impedir ou reduzir as alterações cardiovasculares funcionais encontradas no modelo de hipertensão por inibição crônica da síntese de óxido nítrico por L-NAME.

Esse modelo foi escolhido, pois permite tornar ratos normotensos em hipertensos sem intervenções cirúrgicas ou dietas específicas, e mesmo apresentando fisiopatologia complexa, o fato desse modelo provocar redução da produção da síntese de óxido nítrico, essa redução de NO é uma situação também encontrada em muitas condições

patológicas de hipertensão, disfunção endotelial, processos inflamatórios e principalmente estresse oxidativo (Kitamoto *et al.*, 2000; Koyanagi *et al.* 2000). Além disso, a inibição da síntese de óxido nítrico provoca aumento nos níveis da pressão arterial, provoca também lesões no rim (Ribeiro *et al.*, 1992), no coração (isquemia) e remodelamento miocárdico e vasos sanguíneos (fibrose e hipertrofia) (Moreno *et al.*, 1996) e a complexidade de fatores humorais, como a ativação do sistema renina angiotensina aldosterona (Ribeiro *et al.*, 1992), regulação da proliferação e hipertrofia do miocárdio e vasos (Moreno *et al.*, 1995), e a participação de fatores relacionados ao processo inflamatório (Tomita *et al.*, 1998; Koyanagi *et al.*, 2000) , participação de espécies reativas especialmente ânion superóxido (Kitamoto *et al.*, 2000) envolvidos na fisiopatologia desse modelo contribuem para as alterações cardiovasculares encontradas.

Embora essa redução tenha sido vista nesse estudo clínico sob aquelas condições com comprovação dessa redução pela ação antioxidante do extrato de tomate, os resultados obtidos no nosso estudo com modelo de inibição crônica da síntese de óxido nítrico por L-NAME e tratados concomitantemente com variadas doses de licopeno demonstraram que não houve redução nos parâmetros analisados, ou seja, o tratamento crônico com licopeno em nenhuma das doses de licopeno usadas não impediu as alterações na pressão arterial, débito cardíaco e resistência vascular periférica, encontradas nesse modelo experimental e nessa dose de L-NAME que foi usada.

No que se refere especificamente ao estresse oxidativo provocado nesse modelo, essa ausência de alteração no parâmetro de pressão arterial também foi observada com o uso de outro antioxidante mimético da enzima superóxido dismutase, TEMPOL, onde a administração desse composto não reduziu os níveis pressóricos nesse modelo de hipertensão (Preti *et al.*, 2005), por outro lado essa mesma molécula reduziu a pressão arterial no modelo de hipertensão renovascular dois-rins e 1-clipe (Guron *et al.*, 2006).

Embora o tratamento crônico com licopeno não tenha impedido aparentemente as alterações cardiovasculares funcionais encontradas no modelo de inibição crônica da síntese de óxido nítrico, o licopeno apresentou ação antiinflamatória nos modelos de inflamação aguda usados.

A inflamação consiste em uma reação complexa a vários agentes nocivos, como microrganismos e células danificadas, geralmente necróticas, que consiste de respostas vasculares, migração e ativação de leucócitos e reações sistêmicas. Seu objetivo é fundamentalmente mecanismo de defesa para eliminar a causa da lesão celular e eliminar as consequências de tal lesão.

A fisiopatologia da inflamação é composta de complexas interações celulares e moleculares, mediações por diversos tipos de células e mediadores como por exemplo citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-1, IL-6 e IL-8), a expressão de moléculas de adesão para adesão de leucócitos nas células endoteliais (vascular cell adhesion molecule -1 VCAM-1 e intercellular adhesion molecule -1 -ICAM-1) e a produção elevada de moléculas vasoativas (óxido nítrico e eicosanóides) constituem algumas das etapas fundamentais do desenvolvimento da resposta inflamatória.

Diversos são os fatores que podem desencadear um processo inflamatório como infecções ou toxinas microbianas, trauma, agentes físicos e químicos, necrose tissular, reações imunológicas. Nessa etapa do trabalho analisamos os seguintes modelos de inflamação aguda: 1- inflamação aguda local induzida pela injeção de carragenina na pata, 2- inflamação aguda sistêmica representada pelo processo de isquemia e reperfusão hepática, lesão térmica.

O modelo de edema de pata induzido pela injeção de carragenina foi descrito por Winter *et al.* 1962 e é amplamente usado para avaliar substâncias com propriedades antiinflamatórias, pois produz um estímulo inflamatório agudo local, sem efeitos sistêmicos e com uma boa reprodutibilidade. Esse modelo possui como característica, a formação de edema em duas fases: a fase inicial (1 a 2 horas após a administração da carragenina) seguida de uma fase mais sustentada, a fase tardia (entre 2 a 6 horas após a administração da carragenina). A fase inicial está relacionada com a liberação de mediadores inflamatórios imediatos como histamina, bradicinina, leucotrienos, 5-hidroxitriptamina, enquanto que na fase tardia (entre as 2 e 6 horas) é mediado por prostaglandinas (Di Rosa *et al.*, 1971), espécies reativas derivadas de neutrófilos, peróxido de hidrogênio (Dawson *et al.*, 1991). e peroxinitrito (Salvemini *et al.*, 1996).

Os resultados apresentados nesse modelo, especialmente o grupo carragenina nos mostram que também observamos que a formação de edema da pata foi tempo dependente (Di Rosa *et al.*, 1971), entretanto quando administramos doses crescentes de licopeno observamos que a menor dose de licopeno usada nesse protocolo (1mg/Kg) não reduziu a formação de edema da pata em nenhum dos tempos analisados, mas quando aumentamos a dose de licopeno (10mg/Kg) a partir das 3 horas, já havia uma redução significativa na formação do edema mas não foi sustentada nas 6 horas após a injeção de carragenina. Entretanto, quando aumentamos a dose para 25 mg e 50mg/Kg, observamos que houve uma limitação na formação do edema a partir das já às 3 horas após a administração da carragenina sendo essa redução significativa apenas na dose de 50mg/Kg mas às 6 horas após a administração de carragenina houve uma limitação na formação do edema da pata significativamente nessas duas doses. O interessante dessa informação é que nos tempos analisados (3 e 6 horas), são consideradas fases tardias desse modelo com mediadores envolvidos já citados, mas às 6 horas há uma produção aumentada de espécies reativas na tentativa de eliminar o agente agressor. E justamente nesse tempo é que o licopeno foi mais efetivo.

Além disso, foi claramente visto que o licopeno limitou a formação de edema de forma dose-dependente e nas duas doses que demonstraram mais pronunciado esse efeito, ou seja a redução na formação do edema provocado pela injeção de carragenina foi vista nas doses 25mg e 50mg/Kg e nos tratamentos usados, o agudo e crônico. Especulamos que esse efeito tenha sido devido a fase tardia de formação desse edema, pois é há uma maior produção de espécies reativas derivadas de neutrófilos, peróxido de hidrogênio (Dawson *et al.*, 1991) especialmente peroxinitrito pois o licopeno exibe capacidade de seqüestrar essa espécie reativa (Muzandu *et al.*, 2006). Entretanto as reduções na formação de edema no pré-tratamento com licopeno por 14 dias não apresentou a característica dose-dependente tão evidente quanto à administração aguda mostrou. Isso aconteceu provavelmente devido a diferença nas vias de administração e tempo de tratamento usado nesse modelo.

A grande importância dessa informação é que em ambas as vias de administração usadas o licopeno reduziu a formação do edema nas duas doses de 25 e 50mg/kg.

Outra informação importante observada nesse mesmo experimento no protocolo de tratamento agudo é que as duas doses 25 e 50 produziram a redução na formação de edema na mesma magnitude da redução provocada pela indometacina que é um composto usado como padrão de efeito antiinflamatório.

No que se refere ao modelo isquemia e reperfusão hepática os resultados apresentados demonstram que o processo de isquemia e reperfusão no fígado provocou aumento nos marcadores de lesão ALT, AST, γ GT e LDH onde ALT é um marcador específico de lesão no parênquima hepático, AST e LDH são marcadores de lesão inespecíficos de órgãos em geral e γ GT apesar de marcador inespecífico, é elevado quando há lesão hepática e o pré tratamento com licopeno durante 14 dias na dose 25mg/Kg reduziu substancialmente o grau de lesão no fígado caracterizado pelo aumento nos marcadores de lesão hepática ALT e γ GT. AST é um marcador inespecífico de lesão do parênquima hepático, mas também apresentou redução nos níveis plasmáticos nos animais tratados com licopeno. Entretanto, LDH não apresentou redução mostrando que esse método provou lesões além do fígado e que o licopeno foi mais específico quanto à redução de lesão, esse dado pode ser pelo fato que em ratos o órgão que mais acumula licopeno é o fígado (Boileau *et al.*, 2000), portanto ele exerceu um efeito protetor nesse órgão.

A lesão associada ao processo de isquemia e reperfusão é um complexo fenômeno envolvendo não somente lesão intracelular, mas também uma resposta inflamatória onde pode provocar lesão. Esse fenômeno ocorre quando o fluxo sanguíneo a um órgão ou tecido é diminuído ou interrompido durante um determinado período de tempo, reduzindo assim o aporte de oxigênio e nutrientes às células e posteriormente ao período isquêmico o fluxo de sangue é novamente restaurado. Com o restabelecimento do fluxo sanguíneo, os órgãos sofrem em geral uma agressão maior que a própria privação de oxigênio e nutrientes, agravando a lesão decorrente do período isquêmico. Embora a reperfusão seja fundamental para a sobrevivência do tecido isquêmico, ela própria causa uma lesão celular adicional. Este fenômeno toma a designação de lesão por isquemia e reperfusão. Nesse contexto, o fígado é um dos órgãos mais sensíveis à lesão por esse processo, que pode ser encontrado em situações clínicas como o transplante e outras cirurgias hepáticas, cirurgia cardiovascular com circulação extracorpórea, podendo levar à

estabelecimento de um quadro de disfunção hepatocelular ou até de falência hepática grave (Huguet *et al.*, 1999).

A lesão observada nos órgãos após o início do período de reperfusão é uma consequência direta da complexa interligação entre diferentes mecanismos. No fígado, no início da fase de reperfusão, ocorre uma ativação das células endoteliais, vasoconstrição, recrutamento de leucócitos, e a agregação plaquetária, originando uma significativa alteração na microcirculação. Esta situação prolonga o período de hipóxia, havendo zonas do fígado que permanecem isquêmicas mesmo após o início do período de reperfusão. Após a disfunção microcirculatória ocorre ativação das células de Kupffer e neutrófilos, responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias (Colleti *et al.*, 1996; Jaeschke, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Groot & Rauen, 2007) e espécies reativas, contribuindo para um agravamento da lesão hepática (Shirasugui., 1997; Groot & Rauen, 2007).

A formação de espécies reativas pelos leucócitos fagocitários é um dos mais importantes marcos de todo o processo inflamatório. Uma série de evidências circunstanciadas tem associado às espécies reativas, especialmente o radical superóxido, o radical hidroxilo, peroxinitrito, na lesão provocada na síndrome da lesão por isquemia e reperfusão em particular as espécies reativas geradas na fase de reperfusão (Shirasugui., 1997; Groot & Rauen, 2007). Diversos estudos demonstraram que as espécies reativas são gerados durante o processo de reperfusão em diversos modelos de isquemia e reperfusão incluindo no coração e o grau de lesão provocado pelo aumento na produção de espécies reativas levando a lesão de órgãos pode ser prevenido ou atenuado através do uso de antioxidantes como o licopeno (Bansal *et al.*, 2006). Sepodes *et al.*, demonstrou que o uso de Tempol, composto com atividade antioxidante reduziu o grau de lesão hepática induzida pela isquemia e reperfusão do fígado em ratos (Sepodes *et al.*, 2004).

A dosagem de níveis teciduais de malondialdeído (MDA) revela que a lesão por I/R aumenta a produção de MDA, como consequência do aumento de peroxidação lipídica. O tratamento com licopeno mostrou uma redução na concentração de MDA indicando que a peroxidação lipídica foi reduzida nos animais tratados com licopeno sugerindo que o efeito benéfico demonstrado pelo licopeno no modelo de I/R hepática pode estar relacionada com suas propriedades antioxidantes.

Os resultados obtidos no protocolo de lesão térmica indicam que o uso crônico de licopeno reduziu o grau de lesão hepática, através da redução do marcador específico de lesão hepática ALT. Com relação ao AST, observa-se redução no grupo pré-tratado com licopeno, mas essa redução não foi significativa. Isso pode ter acontecido pela Com relação aos demais parâmetros como marcadores de lesão renal (creatinina e uréia) e pancreática (amilase) o licopeno não reduziu o grau de lesão.

A suplementação com outros compostos com propriedade antioxidante melhorou a lesão múltipla de órgãos sugerindo que o dano provocado pelo estresse oxidativo nesse modelo é responsável não somente pelo dano local, mas também sistêmico na fisiopatologia desse modelo (Horton, 2003; Parihar *et al.*, 2007).

A síndrome da falência múltipla de órgãos é definida como uma progressiva deterioração de funções o qual ocorre em vários órgãos em pacientes que apresentam choque séptico, lesão térmica ou pancreatite (Faist *et al.*, 1983). A lesão térmica usada nessa etapa desse trabalho é uma resposta inflamatória sistêmica envolvendo mecanismos complexos para o grau de lesão sistêmico gerado nesse modelo de inflamação. Essa lesão assim como a já descrita isquemia e reperfusão inicia uma complexa resposta inflamatória caracterizada pela ativação do sistema complemento que ativa polimorfonucleares neutrófilos gerando espécies reativas (principalmente peroxinitrito, radical superóxido, peróxido de hidrogênio), prostanoídes e proteases lisossomais. Esses mediadores inflamatórios causam injúria vascular e danos em órgãos.

Em suma, apesar do tratamento crônico com licopeno não ter provocado alteração nos parâmetros analisados no modelo de hipertensão por administração de L-NAME, nos modelos de inflamação, o uso desse composto mostrou atividade antiinflamatória e proteção hepática. Diante disso, o consumo de alimentos ricos em licopeno, além do caráter nutricional, pode trazer benefícios na profilaxia de danos decorrentes de processos inflamatórios e que o uso regular de alimentos ricos nesse nutriente pode trazer benefícios à saúde.

6- CONCLUSÃO

- O tratamento com licopeno não preveniu as alterações cardiovasculares funcionais características do modelo de inibição da síntese de óxido nítrico;
- Nos processos inflamatórios agudos locais o licopeno age como antiinflamatório tanto na exposição aguda quanto na exposição crônica e sua ação aguda é forma dose-dependente;
- O uso crônico do licopeno limitou a lesão hepática nos modelos de inflamação sistêmica estudados.

Portanto, embora o uso de licopeno não tenha produzido efeitos benéficos nessas condições experimentais de hipertensão provocados pelo modelo de inibição da síntese de óxido nítrico, o uso produziu efeito antiinflamatório sugerindo que o uso contínuo de alimentos ricos em licopeno contribuirá para profilaxia de danos provocados por processos inflamatórios e sua ação hepatoprotetora demonstrada nesse trabalho parece ser um composto com grande importância na proteção do fígado em condições associadas à isquemia e reperfusão hepática e assim é um importante composto de fácil acesso com ação farmacológica quando se pretende a busca na conservação de órgãos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal A, Rao AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic disease. *Can Med Assoc J* 2000; 163: 457-465.

Arai S. Studies on functional foods in Japan - state of the art. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996; 60: 9-15.

Arab L, Steck S. Lycopene and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1691S-5S.

Bansal P, Gupta SK, Ojha SK, Nandave M, Mittal R, Kumari S *et al.* Cardioprotective effect of lycopene in the experimental model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 2006; 1-9.

Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999; 65(18-19):1865-74.

Boileau TW, Boileau AC, Erdman Junior J. Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene. *Biol Med* 2002; 227:914-919.

Boileau TWM, Clinton SK, Erdman Junior JW. Tissue lycopene concentrations and isomer patterns are affected by androgen status and dietary lycopene concentration in male F344 rats. *J Nutr* 2000; 130:1613-1618.

Bunker CH, McDonald AC, Evans RW, de La Rosa N, Boumosleh JM, Patrick AL. A randomized trial of lycopene supplementation in Tobago men with high prostate cancer risk. *Nutr Cancer* 2007; 57(2):130-7.

Canene-Adams K, Campbell JK, Zaripheh S, Jeffery EH, Erdman Junior JW. The Tomato as a Functional Food. *J. Nutr* 2005; 135: 1226-1230.

Clinton SK. Lycopene: chemistry, biology and implications for human health and disease. *Nutrition Reviews* 1998; 56: 35-51.

Colleti LM, Kunkel SL, Walz A. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996; 23:506-4.

Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition* 1996; 12: 274-277.

Dawson J, Sedgwick AD, Edwards JC, Lees P. A comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse. *Int J Tissue React* 1991; 13: 171-85.

Dell'Agli M, Buscialà A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res* 2004; 63(4):593-602.

Devaraj S, Mathur S, Basu A, Aung HH, Vasu VT, Meyers S *et al.* A dose-response study on the effects of purified lycopene supplementation on biomarkers of oxidative stress. *J Am Coll Nutr* 2008; 27(2):267-73.

Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274(2): 532-8.

Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol* 1971; 104,15-29.

Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.

Engelhard YN, Gazer B, Paran E. Natural antioxidants from tomatoes extract reduce blood pressure in patients with grade-1 hypertension: a double-blind, placebo-controlled pilot study. *Am heart J* 2006; 151:100e1-100e6.

Ettarh RR, Odigie IP, Adigun SA. Vitamin C lowers blood pressure and alters vascular responsiveness in salt-induced hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80(12): 1199-202.

Faist E, Baue AE, Dittmer H, Heberer G. Multiple organ failure in poly-trauma patients. *J Trauma* 1983; 23: 775-787.

Fantone JC, Ward PA. A review: role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1982; 107:395-418.

Ferrari R, Alfieri O, Curello S, Ceconi S, Cargnoni A, Marzollo P *et al.* Occurrence os stress oxidative during reperfusion of the human heart. *Circulation* 1990; 81: 201-211.

Freeman VL, Meydani M, Yong S, Pyle J, Wang Y, Arvizu-Durazo R *et al.* Prostatic levels of tocopherols, carotenoids, and retinol in relation to plasma levels and self-reported usual dietary intake. *Am J Epidemiol* 2000; 151:109-118.

Fuhrman B, Elis A, Aviram M. Hypocholesterolemic effect of lycopene and beta-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233(3):658-62, 1997.

Gerster H. The potential role of lycopene for human health. *J Am Coll Nutr* 1997; 16:109-126.

Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Intake of carotenoids and retinal to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(3): 1767-76.

Giovannucci E. Tomato products, lycopene, and prostate cancer: a review of the epidemiological literature. *J Nutr* 2005; 135 (8): 2030S-1S.

de Groot H, Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: Process in pathogenetic networks a review. *Transplant Proc* 2007; 39: 481-484.

Guron GS, Grimberg ES, Basu S, Herlitz H. Acute effects of the superoxide dismutase mimetic tempol on split kidney function in two-kidney one-clip hypertensive rats. *J Hypertens* 2006; 24(2):387-94.

Heber D, Lu QY. Overview of mechanism of action of lycopene. *Exp Biol Med* 2002; 227:920-923.

Hertog M, Feskens E, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342: 1007-11.

Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F *et al.* Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 1995; 155(4): 381-6.

Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology* 2003; 189(1-2):75-88.

Huguet C, Addario-Chieco P, Gavelli A, Arrigo E, Harb J, Clement RR. Technique of hepatic vascular exclusion for extensive liver resection. *Am J Surg* 1992; 163(6):602-5.

Ibrahim HS, Ahmed LA, El-Din MM. The functional role of some tomato products on lipid profile and liver function in adult rats. *J Med Food* 2008; 11(3):551-9.

Irigoyen MC, Moreira ED, Cestari IA, Krieger E.M. The relationship between renal sympathetic nerve activity and arterial pressure after selective denervation of baroreceptors and chemoreceptors. *Braz J Med Biol Res* 1991; 24(2): 219-22.

Jaeschke H. Mechanism of liver injury. Mechanism of neutrophil induced liver cell injury during hepatic ischemia reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290:1083-1088.

Kaplan LA, Lau JM, Stein EA. Carotenoid composition, concentrations, and relationships in various human organs. *Clin Physiol Biochem* 1990; 8:1–10.

Kitamoto S, Egashira K, Kataoka C, Usui M, Koyanagi M, Takemoto M *et al.* Chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats increases aortic superoxide anion production via the action of angiotensin II. *J Hypertens* 2000; 18:1795-1800.

Korytko PJ, Rodvold KA, Crowell JA, Stacewicz-Sapuntzakis M, Diwadkar-Navsariwala V, Bowen PE *et al.* Pharmacokinetics and tissues distribution of orally administered lycopene in male dogs. *J Nutr* 2003; 133: 2788-2792.

Koyanagi M, Egashira K, Kitamoto S, Ni W, Shimokawa H, Takeya M *et al.* Role of transforming growth factor-beta 1 in cardiovascular inflammatory changes induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Hypertension* 2000; 35 (1): p.86-90.

Landolfi R, Mower R, Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 1525– 30.

Liu X, Allen JD, Arnold JT, Blackman MR. Lycopene inhibits IGF-I signal transduction and growth in normal prostate epithelial cells by decreasing DHT-modulated IGF-I production in co-cultured reactive stromal cells. *Carcinogenesis* 2008; 29(4):816-23.

Lopez-Varela S, Gonz  les-Gross M, Marcos A. Funcional foods and the immune system: a review. *Eur J Clin Nutrition* 2002; 56: S29-S33.

Lunec J, Holloway KA, Cooke MS, Faux S, Griffiths HR, Evans MD. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? *Free Radic Biol Med* 2002; 33(7):875-85.

Moreno Júnior H, Metze K, Bento AC, Antunes E, Zatz R, De Nucci G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. *Basic Res Cardiol* 1996; 91: 248-255.

Moreno Júnior H, Nathan LP, Metze K, Costa SKP, Antunes E, Hyslop S *et al.* Non-specific inhibitors of nitric oxide synthase cause myocardial necrosis in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 24(5): 349-352.

Moritz B, Tramonte VLC. Biodisponibilidade do licopeno. *Rev Nutr* 2006; 19(2): 265-273.

Muzandu K, Ishizuka M, Sakamoto KQ, Shaban Z, Bohi K, Kazusaka A *et al.* Effect of lycopene and B-carotene on peroxynitrite-mediated cellular modifications. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 1-11.

Obermüller-Jevic UC, Olano-Martin E, Corbacho AM, Eiserich JP, Van Der Vliet A, Valacchi G. *et al.* Lycopene inhibits the growth of normal human prostate epithelial cells in vitro. *J Nutr* 2003; 133(11):3356-60.

Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns* 2008; 34 (1): 6-17.

Reifen R, Nissenkorn A, Matas Z, Bujanover Y. 5-ASA and lycopene decrease the oxidative stress and inflammation induced by iron in rats with colitis. *J Gastroenterol* 2004; 39(6):514-519.

Riccioni G, Mancini B, Di Ilio E, Bucciarelli T, D'Orazio N. Protective effect of lycopene in cardiovascular disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2008; 12(3):183-90.

Ribeiro MO, Antunes E, De Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992; 20: 298-303.

Rinne T, Mutschler E, Wimmer-greinecker G, Moritz A, Olbrich HG. Vitamins C and E protect isolated cardiomyocytes against oxidative damage. *Int J Cardiol* 2000; 75: 275-281.

Saganuma H, Inakuma T. Protective effect of dietary tomato against endothelial dysfunction in hypercholesterolemic mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999; 63(1): 78-82.

Salvemini D, Wang ZQ, Bourdon DM, Stern MK, Currie MG, Manning PT. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. *Eur J Pharmacol* 1996; 303: 217-220.

Sepodes B, Maio R, Pinto R, Marques C, Mendes-do-vale J, McDonald MC *et al.* Tempol, an Intracellular Free Radical Scavenger, Reduces Liver Injury in Hepatic Ischemia-Reperfusion in the Rat. *Transplant Proc* 2004; 36: 849-853.

Shami NJIE, Moreira EAM. Licopeno como agente antioxidante. *Rev Nutr* 2004; 17(2): 227-236.

Shirasugui N, Wakabayashi G, Shimazu M, Oshima A, Shito M, Kawachi S *et al.* Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 1997; 64:1398-403.

Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985; 311(1152):617-31.

Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 15(2): 213-9.

Siler U, Herzog A, Spitzer V, Seifert N, Denelavas A, Hunziker PB *et al.* Lycopene effects on rat normal prostate and prostate tumor tissue. *J Nutr* 2005; 135(8): 2050S-2S.

Stahl W, Schwarz W, Sundquist AR, Sies H. Cis-trans isomers of lycopene and carotene in human serum and tissues. *Arch Biochem Biophys* 1992; 294:173-177.

Schwarz S, Obermüller-Jevic UC, Hellmis E, Koch W, Jacobi G, Biesalski HK. Lycopene inhibits disease progression in patients with benign prostate hyperplasia. *J Nutr* 2008; 138(1):49-53.

Tang L, Jin T, Zeng X, Wang JS. Lycopene inhibits the growth of human androgen-independent prostate cancer cells in vitro and in BALB/c nude mice. *J Nutr* 2005; 135(2): 287-90.

Taha MO, Carvalho CA, Souza HS, Fagundes DJ, Simões MJ, Novo NF *et al.* Cytoprotective effects of alpha-tocopherol on ischemia/reperfusion injury in rat liver: biochemical and histological evaluation. *Transplant Proc* 2004; 36: 276-282.

Taha MO, Souza HS, Carvalho CA, Fagundes DJ, Simões MJ, Novo NF *et al.* Cytoprotective effects of ascorbic acid on the ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Transplant Proc* 2004; 36: 296-300.

Tomita H, Egashira K, Kubo-inoue M, Usui M; Koyanagi M, Shimokawa H *et al.* Inhibition of NO synthesis induces inflammatory changes and monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat hearts and vessels. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 1998; 18:1456-1464.

Toyokuni S. Molecular mechanisms of oxidative stress-induced carcinogenesis: from epidemiology to oxygenomics. *IUBMB Life* 2008; 60(7):441-7.

Ülker S, Mckeown PP, Bayraktutan U. Vitamins Reverse Endothelial Dysfunction Through Regulation of eNOS and NAD(P)H Oxidase Activities. *Hypertension* 2003; 41:534-539.

Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br Med Bull* 1993; 49: 506-22.

Winter C.A, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 111: 544-547.

Yu BP. Cellular defense against damage from reative oxygen species. *Physiol Ver* 1994; 74(1):139-62.

Zhang JX, Wu HS, Wang H, Zhang JH, Wang Y, Zheng QC. Protection against hepatic ischemia/reperfusion injury via downregulation of toll-like receptor 2 expression by inhibition of Kupffer cell function. *World J Gastroenterol* 2005; 11(28): 4423-6.

8- ANEXOS

To ensure proper functionality of this site, both [JavaScript](#) and [Cookies](#) must be enabled

Manuscript #	BJN-2007-012676RR
Current Revision #	2
Other Versions	BJN-2007-012676 BJN-2007-012676R
Submission Date	22nd Sep 08
<u>Current Stage</u>	Accepted
Title	Anti-inflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw edema and hepatic ischemia-reperfusion in the rat
Manuscript Type	Research Article
Special Section	N/A
Category	Other
Corresponding Author	Helder Mota-Filipe (hfilipe@ff.ul.pt) (Faculty of Pharmacy - University of Lisbon)
Contributing Authors	Leticia Bignotto , Joao Rocha , Bruno Sepodes , Maria Eduardo-Figueira , Rui Pinto , Marco Chaud , Joao Carvalho , Heitor Moreno Junior , Helder Mota-Filipe
Sources of Funding	Leticia Maria Bignotto was supported by a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
Abstract	The regular intake of tomatoes or its products has been associated to a reduced risk of chronic diseases and these effects have been mainly attributed to lycopene. Here we evaluated the anti-inflammatory properties of lycopene and its protective effects on organ injury in two experimental models of inflammation. In order to study the effects of lycopene in local inflammation, a carrageenan-induced paw edema model in rats was performed. Lycopene was administered as an acute (1, 10, 25 or 50 mg/kg, i.p, 15 minutes before carrageenan injection) and chronic treatment (25 or 50 mg/Kg/day, 14 days). Inflammation was assessed by measurement of paw volume increase after 6h. Lycopene significantly inhibited paw edema formation at two doses (25 and 50 mg/Kg) in both acute and repeated administration. Lycopene effect on liver inflammation was evaluated in a liver ischemia-reperfusion (I/R) model. Rats were subjected to 45 minutes of ischemia to 3/4 of the liver

Key Words	Lycopene, inflammation, antioxidant, liver ischemia-reperfusion, paw edema
Conflict of Interest	No , there is no conflict of interest that I should disclose, having read the above statement.

Manuscript Items

1. Rebuttal Letter "Rebuttal Letter" [PDF \(14KB\)](#)
2. Article File #1 [PDF \(105KB\)](#)
3. Figure 1 [PDF \(17KB\)](#)
4. Figure 2 [PDF \(80KB\)](#)
5. Figure 3 [PDF \(16KB\)](#)
6. Figure 4 [PDF \(14KB\)](#)
7. Figure 5 [PDF \(16KB\)](#)
8. Table - Table 1 [PDF \(67KB\)](#)
9. Merged File containing manuscript text, 5 Figure files and 1 Table file. [PDF \(296KB\)](#)

[Previous Decision Letter \(Blind reviews at bottom of letter\)](#)

Manuscript Tasks

[Send Manuscript Correspondence](#)

[Check Status](#)



MANUSCRIPT HOME	AUTHOR INSTRUCTIONS	REFeree INSTRUCTIONS	CONTACT BJN	TIPS	LOGOUT	JOURNAL HOME
TERMS OF SERVICE						

TITLE PAGE

1-Article title: Anti-inflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw edema and hepatic ischemia-reperfusion in the rat

2- Authors: Letícia Bignotto¹, João Rocha², Bruno Sepodes², Maria Eduardo-Figueira², Rui Pinto², Marco Chaud³, João de Carvalho⁴, Heitor Moreno Jr¹ and Helder Mota-Filipe²

¹Departamentos de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil

²iMED.UL – Inflammation Team, Pharmacological Sciences Group – Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Portugal

³Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba-SP, Brasil

⁴Divisão de Farmacologia, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas- Universidade Estadual de Campinas, Paulínia- SP, Brasil

3- Address for correspondence

Helder Mota-Filipe, PharmD, PhD.

Unit of Pharmacology and Pharmacotoxicology, Faculty of Pharmacy – University of Lisbon, Avenida das Forças Armadas, 1649-019 Lisboa, Portugal.

Phone: +351 21 794 64 22

E-mail: hfilipe@ff.ul.pt

4- Institution at which this work was performed: Unit of Pharmacology and Pharmacotoxicology, Faculty of Pharmacy – University of Lisbon, Portugal

5- Keywords: Lycopene, inflammation, paw edema, ischemia-reperfusion, liver.

24 **ABSTRACT**

25 The regular intake of tomatoes or its products has been associated to a reduced risk of chronic diseases
26 and these effects have been mainly attributed to lycopene. Our aim was to evaluate the anti-
27 inflammatory properties of lycopene and its protective effects on organ injury in two experimental
28 models of inflammation. In order to study the effects of lycopene in local inflammation, a carrageenan-
29 induced paw edema model in rats was performed. Lycopene was administered as an acute treatment (1,
30 10, 25 or 50 mg/kg, i.p, 15 minutes before carrageenan injection) and as chronic treatment (25 or 50
31 mg/Kg/day, 14 days). Inflammation was assessed by measurement of paw edema volume increase after
32 6h. Lycopene effect on liver inflammation was evaluated in a liver ischemia-reperfusion (I/R) model.
33 Rats were subjected to 45 minutes of ischemia to 3/4 of the liver followed by 2 hours of reperfusion.
34 Liver injury was assessed by measurement of the serum levels of aspartate aminotransferase, alanine
35 aminotransferase, lactate dehydrogenase and gamma-glutamyl transferase. In this model, lycopene was
36 administered daily at two doses (25mg/kg and 50mg/kg) in the 14 days that preceded the experiments.
37 Results showed that lycopene significantly inhibited rat paw edema formation at two doses (25 and 50
38 mg/Kg) in both acute and repeated administration. Repeated administration of lycopene also reduced
39 liver injury induced by ischemia-reperfusion. Our results show that lycopene exhibited local anti-
40 inflammatory activity and also attenuated liver injury induced by I/R. We speculate that lycopene
41 administration might be useful in the pharmacological modulation of inflammatory events.

42

43 INTRODUCTION

44

45 Tomato is one of the most widely consumed fruit/vegetable in the Western civilization and it is rich in
46 lycopene and other carotenoids (such as α -, β -, γ -carotene, lutein), potassium, folate, vitamin C and
47 vitamin E⁽¹⁾. There is epidemiological data supporting the association between an increased
48 consumption of tomatoes or its products and a reduced risk for developing chronic diseases such as
49 cancer^{2,3} and cardiovascular disease (CVC)^(1,4,5). These beneficial effects are generally attributed to the
50 antioxidant properties of lycopene^(6,7), an acyclic carotenoid with 11 linearly arranged conjugated
51 double bonds^(6,7,8,9). Lycopene functions as a very potent antioxidant, and this is clearly a major
52 important mechanism of lycopene action. In this regard, lycopene can trap singlet oxygen and reduce
53 mutagenesis in the Ames test⁽¹⁰⁾.

54 Experimental rodent models suggest that lycopene plays an important role in the modulation of organ
55 injury evoked by inflammatory processes.

56 The efficacy of lycopene as an anti-inflammatory agent in colitis was evaluated in a rat model of colitis
57 induced by iodoacetamide. This model induces colonic injury due to the production of tissue
58 inflammatory mediators and oxidative radicals. Supplementation of normal diet with lycopene (200mg
59 per kg of normal diet) reduced the histological signs of colon injury, reduced tissue malondialdehyde
60 levels and increased superoxide dismutase levels in the red blood cells⁽¹¹⁾.

61 The efficacy of lycopene to limit myocardial injury after ischemia and reperfusion was assessed in a
62 model of 45 min of occlusion of the left anterior descending coronary artery followed by 1 hour of
63 reperfusion in Wistar rats. Daily administration of lycopene (1mg/kg, p.o.) 31 days prior to experiments
64 resulted in a reduction of histological myocardial damage, in preservation of the myocardial antioxidant
65 status and inhibition of I/R induced lipid peroxidation⁽¹²⁾.

66 These results suggest that the beneficial effects of lycopene in inflammatory models are probably
67 related to its antioxidant properties.

68 A vast amount of circumstantial evidence implicates oxygen-derived free radicals (especially
69 superoxide and hydroxyl radical) and high-energy oxidants (such as peroxynitrite) in the ischemia-
70 reperfusion (I/R) injury syndrome, particularly during the reperfusion phase. Generation of free radicals
71 during the reperfusion process can be prevented or attenuated by antioxidants and free radical
72 scavengers⁽¹³⁾.

73

74 Hence, in this study, we aimed to evaluate the possible local anti-inflammatory properties of lycopene
75 in acute and repeated administration, and also the effect of repeated administration of lycopene in
76 hepatic injury caused by ischemia-reperfusion of the liver.

77

78

79 MATERIAL AND METHODS

80 Chemicals

81 Redivivo™ (Lycopene 10% WS - Code 0481041) was obtained from DSM Nutritional Products (São
82 Paulo-SP, Brasil). Redivivo™ contains 10% synthetic lycopene finely dispersed in a cornstarch-coated
83 matrix of fish gelatin, sucrose and corn oil.

84 Pentobarbital sodium (Eutasil) was obtained from Sanofi Veterinária (Miraflores, Algés, Portugal).

85 Other compounds were obtained from Sigma-Aldrich Química SA (Sintra, Portugal).

86

87 Experimental methods

88 Experiments were conducted according with the Home Office Guidance in the Operation of Animals
89 (Scientific Procedures) Act 1986, published by Her Majesty's Stationary Office, London, U.K. and the
90 Institutional Animal Research Committee Guide for the care and Use of Laboratory Animals published
91 by the U.S. National Institutes of Health (N.I.H. publication N°. 85-23, revised 1996), as well as with
92 the EC regulations (O. J. of E.C. L 358/1 18/12/1986). Paw edema studies were carried out using male
93 Wistar rats weighing 100-150 g (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain). Ischemia reperfusion studies were
94 carried out using male Wistar rats weighing 250-320 g (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain). All animals
95 received a standard diet and water *ad libitum*.

96

97 Paw edema

98 The carrageenan-induced paw edema of the rat hindpaw, is a suitable model to study acute local
99 inflammation and widely considered to be one of the most useful models in the evaluation of anti-
100 inflammatory activity of investigational compounds^(14,15).

101

102 Paw edema was induced by a single subplantar injection into the rat left hind paw of 0.1 ml of a 1% λ -
103 carrageenan sterile saline solution. Paw volume was measured by means of a volume displacement
104 method using a plethysmometer (Digital Plethysmometer LE7500 – Letica Scientific Instruments). Paw
105 volume was measured immediately after injection of carrageenan (V_0 or basal volume) and 6 hours
106 later (V_{6h}).

4

107 Paw edema was expressed as percentage of increase in paw volume 6 hours after carrageenan injection
108 relative to the basal values according to the equation: $\% = (V_{6h} - V_0 / V_0) \times 100$.

109

110 The rats were randomly allocated into different groups as described for each experiment:

111

112 **Paw edema acute dosing study**

113 (i) Control Group: animals were subjected to subplantar injection into the rat left hind paw of 0.1 ml
114 sterile saline and administered with saline (1ml/kg, i.p.) ($n=6$);

115 (ii) Carrageenan Group: animals subjected to paw edema induction and administered with saline
116 (1ml/kg, i.p.) ($n=8$);

117 (iii) Lycopene1 Group: animals subjected to paw edema induction and pre-treated with lycopene
118 (1mg/kg, i.p.) 15 minutes before λ -carrageenan injection ($n=7$);

119 (iv) Lycopene10 Group: animals subjected to paw edema induction and pre-treated with lycopene (10
120 mg/kg, i.p.) 15 minutes before λ -carrageenan injection ($n=7$);

121 (v) Lycopene25 Group: animals subjected to paw edema induction and pre-treated with lycopene
122 (25mg/kg, i.p.) 15 minutes before λ -carrageenan injection ($n=7$);

123 (vi) Lycopene50 Group: animals subjected to paw edema induction and pre-treated with lycopene
124 (50mg/kg, i.p.) 15 minutes before λ -carrageenan injection ($n=8$);

125 (vii) Trolox Group: animals subjected to paw edema induction and pre-treated with trolox (30mg/kg,
126 i.p.) 15 minutes before λ -carrageenan injection ($n=8$);

127 (viii) Tempol Group: animals subjected to paw edema induction and pre-treated with tempol (30mg/kg,
128 i.p.) 15 minutes before λ -carrageenan injection ($n=10$);

129 (ix) Indomethacin Group: animals subjected to paw edema induction and pre-treated with indomethacin
130 (10mg/kg, i.p.) 15 minutes before λ -carrageenan injection ($n=8$);

131

132 **Paw edema repeated-dose study (14 days)**

133 The animals were subject to daily administration of lycopene by gastric gavage in the 14 days that
134 preceded the experiments.

135 (i) Control Group: animals subjected to subplantar injection into the rat left hind paw of 0.1 ml sterile
136 saline containing 1% λ -carrageenan and administered with saline (1 ml/kg, p.o.) during 14 days ($n=11$);

137 (ii) Lycopene25 Group: animals subjected to paw edema induction and treated with lycopene (25
138 mg/kg, p.o.) during 14 days ($n=14$);

139 (iii) Lycopene50 Group: animals subjected to paw edema induction and treated with lycopene (50
140 mg/kg, p.o.) during 14 days (n=14).

141

142 **Repeated dose toxicity study**

143 Animals were subjected to daily administration of lycopene by gastric gavage in the 14 days that
144 preceded the experiments to evaluate possible repeat dose associated toxicity.

145 The rats were randomly assigned to three groups as described:

146 (i) Control Group: animals received only water during 14 days (n=10);

147 (ii) Lycopene25 Group: animals were treated with lycopene (25 mg/kg, per day) during 14 days
148 (n=10);

149 (iii) Lycopene50 Group: animals were treated with lycopene (50 mg/kg, per day.) during 14 days
150 (n=10).

151 At the end of the chronic treatment with lycopene, rats were sacrificed by overdose of sodium
152 pentobarbital and blood was collected by cardiac puncture into a serum SST₂ gel and clot activator
153 tube (Becton 3,4 Dickinson, France) and was centrifuged (3000 rpm for 10 min at room temperature) to
154 separate serum. Serum was analyzed by a local laboratory for clinical chemistry - Clinica Medica e
155 Diagnostico Dr Joaquim Chaves (Miraflores, Alges, Portugal). Alanine aminotransferase (ALT, a
156 specific marker for hepatic parenchymal injury) and aspartate aminotransferase (AST, a nonspecific
157 marker for hepatic injury) were measured to evaluate the liver function. Lactate dehydrogenase (LDH,
158 an unspecific cellular injury marker) was measured to evaluate the general organic function. Amylase
159 was measured to evaluate the pancreatic function. Urea and creatinine were measured to evaluate renal
160 function.

161

162 **Liver ischemia/reperfusion (I/R) study**

163 The liver, and in particular hepatic cells, plays a central role in the metabolism of the several
164 compounds such as vitamins, lipids, drugs, etc. Ischemia-reperfusion liver injury occurs in several
165 clinical and pathological situations and consists of an interruption of blood supply to the liver followed
166 by reperfusion. When the blood supply is restored, the organs are usually subjected to a further insult,
167 aggravating the injury created within the ischemic period^(16,17). This reperfusion insult is a direct
168 consequence of a complex interplay between different mechanisms. At the beginning of liver
169 reperfusion, microcirculation failure results from endothelial cell activation, vasoconstriction,
170 leukocyte recruitment and entrapment (leukostasis), and platelet aggregation within the sinusoids⁽¹⁸⁾.
171 These effects prolong hypoxia, since areas of the liver remaining ischemic despite the onset of

172 reperfusion, resulting in activation of Kupffer cells and neutrophils, which produce proinflammatory
173 cytokines and oxygen-derived free radicals, further aggravating the hepatic injury^(19,20).

174

175 For these experiments, all rats were anesthetized with sodium pentobarbital (Eutasil, 60 mg/kg i.p.;
176 Sanofi Veterinaria, Portugal) and anesthesia was maintained by supplementary i.p. bolus of sodium
177 pentobarbital. Briefly, anesthetized rats were placed onto a thermostatically controlled heating mat
178 (Harvard Apparatus Ltd, Kent, UK) and body temperature maintained at 37 ± 0.5 °C by means of a
179 rectal probe attached to a homoeothermic blanket. A tracheotomy was performed to maintain airway
180 patency and to facilitate spontaneous respiration. The jugular vein was cannulated (PP25, I.D. 0.40
181 mm; Portex) for the administration of saline or anesthesia as required. A midline laparotomy was
182 performed in order to carefully expose the liver.

183 The rats were randomly allocated into five groups as described:

184 i) Control Group: data from nonmanipulated animals – rats which were not subjected to any surgical
185 procedure (n=10);

186 ii) Sham Group: rats which were subjected to the surgical procedures described below except for liver
187 I/R. Rats which received vehicle as a daily administration by gastric gavage in the 14 days that
188 preceded the experiments to liver I/R, and maintained under anesthesia for the duration of the
189 experiment (n=11);

190 iii) I/R Group: rats which were subjected to the surgical procedures described below and underwent
191 liver ischemia for 45 min followed by reperfusion for 2 h (n=8);

192 iv) I/R + Lycopene Group: rats which received lycopene (25 mg/kg, per day) as a daily administration
193 by gastric gavage in the 14 days that preceded the experiments and underwent the full I/R procedure
194 (n=7);

195 v) Lycopene Group: rats which received lycopene (25 mg/kg, per day) as a daily administration by
196 gastric gavage in the 14 days that preceded the experiments and underwent the surgical procedures
197 described for the Sham Group (n=14).

198

199 For the liver I/R surgical procedures, ligament attachments connecting the liver, diaphragm, abdominal
200 wall and neighbouring organs were divided. The liver hilus was exposed to find the common hepatic
201 artery and the portal vein. A vascular microclamp was used to interrupt the portal venous and arterial
202 hepatic blood supply to the three cephalic lobes of the liver during 45 min. The three caudal lobes
203 retained and intact portal inflow and venous outflow, preventing the intestinal venous congestion and
204 possible leakage of bacteria or bacterial products to the circulation. Reperfusion commenced once the

7

205 vascular clip was removed, and was allowed to proceed for 2 h. Occlusion was verified visually by
206 change in the colour of the liver to a paler shade, and reperfusion by a blush. Other rats were subjected
207 to sham-operation (Sham-operated), which underwent identical surgical procedures to I/R Group rats
208 but did not undergo I/R of the liver clamping and were maintained under anaesthesia for the duration of
209 the experiment. At the end of all experiments, rats were sacrificed by an overdose of anaesthetic.

210

211 **Measurement of biochemical parameters**

212 At the end of the reperfusion period for the liver I/R experiments and whenever appropriate regarding
213 other experiments, blood was collected into a serum SST gel and clot activator tube (Becton 3,4
214 Dickinson, France) and was centrifuged (3000 rpm for 10 min at room temperature) to separate serum.
215 Serum was analyzed within 24 h by a laboratory for clinical chemistry - Clinica Medica e Diagnostico
216 Dr Joaquim Chaves (Miraflores, Alges, Portugal). Liver injury was assessed by measuring the rise in
217 the serum levels of alanine aminotransferase (ALT, a specific marker for hepatic parenchymal injury),
218 aspartate aminotransferase (AST, a nonspecific marker for hepatic injury) and gamma-glutamyl
219 transferase (γ -GT, a very sensitive but nonspecific indicator of liver disease with the increased activity
220 found in both the cholestasis and hepatocellular damage).

221

222 **Measurement of liver tissue malondialdehyde (MDA)**

223 Malondialdehyde (MDA) levels in the liver tissue were determined as an indicator of lipid
224 peroxidation. Briefly, liver tissues, collected at the end of the I/R experiment, were homogenized in
225 1.15% KCl solution. An aliquot (100 μ L) of the homogenate was added to a reaction mixture
226 containing 200 μ L of 8.1% (w/v v/v) SDS, 1500 μ L of 20% (v/v) acetic acid (pH 3.5), 1500 μ L of
227 0.08% (w/v) thiobarbituric acid, and 700 μ L distilled water. Samples were then boiled for 1 h at 95 °C
228 and centrifugated at 3000 g for 10 min. The absorbance of the supernatant was measured by
229 spectrophotometry at 650 nm.

230

231 **Measurement of antioxidant capacity**

232 The method for determining the antioxidant capacity of the extract used was the Oxygen Radical
233 Absorbance Capacity method (ORAC) described by Ou et al. 2001. This method is based on the ability
234 of certain substances to inhibit fluorescein oxidation induced by peroxy radicals (ROO $\cdot$) generated by
235 AAPH (2',2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride). The assay consists on the addition of
236 300 μ L of sample to a fluorescein solution (1800 μ L, 4x10-6mM) at 37°C. After AAPH addition, the

8

237 mixture's fluorescence is measured every minute, during 30 minutes ($\lambda_{em}=515nm$, ($\lambda_{em}=493nm$). All
238 solutions are prepared in PBS (75mM, pH 7.4). Antioxidation values are calculated through the loss of
239 fluorescein fluorescence through the 30 minutes by comparison to an antioxidant standard – Trolox.
240 The final result is expressed in terms of Trolox equivalent Antioxidant Capacity (TEAC).

241

242 **Statistical Analysis**

243 The results were expressed as the mean $\pm$ SEM and were compared using a one-factorial ANOVA test,
244 followed by a Dunnet's post-test. A P value less than 0.05 was considered to be statistically significant.

245

246 **RESULTS**

247 **Paw edema acute dosing study**

248 Intraplantar injection of carrageenan in rats led to an increase in paw volume after 6 hours ($46.9\% \pm$
249 7.6) when compared with the control group (Fig 1). This increase was significantly reduced in a dose-
250 dependent manner by pre-treatment with lycopene, with the most significant effect observed at the
251 doses 25 mg/kg and 50 mg/kg.

252 Comparison of the effect of a single administration of lycopene (25 mg/kg and 50 mg/kg) with the
253 effect of tempol (30 mg/kg), trolox (30 mg/kg) and indomethacin (10 mg/kg) showed that the lycopene
254 administration reduced edema formation in the same magnitude as tempol, trolox and indomethacin
255 (Fig 2).

256

257 **Paw edema repeated dose study**

258 Carrageenan-induced edema was significantly reduced in animals treated daily with lycopene at the
259 doses 25mg/kg and 50 mg/kg for 14 days (Fig 3). The reduction of carrageenan-induced edema was not
260 significant different between the doses 25 mg/Kg and 50 mg/Kg.

261

262 **Repeated dose toxicity study (14-days)**

263 Daily administration of lycopene during 14 days at the doses of 25 and 50 mg/Kg, didn't exhibit any
264 significant differences in ALT, AST, LDH, amylase, urea and creatinine serum levels when compared
265 with the control group (Table 1).

266

267

268

269 **Effect of lycopene treatment on liver injury**

270 In sham-operated rats, the surgical procedure did not produce a significant change in serum levels of
271 AST (Fig 4a), ALT (Fig 4b) compared with the control group. When compared with sham-operated
272 rats, I/R of the liver resulted in significant rises in the serum levels of the marker enzymes AST, ALT
273 and γ -GT, demonstrating the development of hepatocellular injury. In rats subjected to I/R pre-treated
274 with lycopene no significant rise γ -GT serum levels were detected when compared with sham group
275 (Figs 5). Significant rises in the serum levels of the enzymes AST and ALT were observed in the group
276 pre-treated with lycopene plus I/R when compared Sham group but the serum levels of these marker
277 enzymes were lower than I/R group (Fig 4 a and b). Lycopene by itself, when administered to rats not
278 subjected to I/R injury, had no significant effect on AST and ALT levels (Fig 4a and Fig 4b).

280 **Effect of lycopene treatment on the liver tissue levels of MDA**

281 Pretreatment with lycopene resulted in a decrease on the liver MDA levels when compared with the
282 liver samples from the I/R group. This indicates that lipid peroxidation of the liver tissue was reduced
283 on the pretreated organs subjected to I/R (Fig. 6).

285 **Antioxidant capacity**

286 The antioxidant capacity of lycopene, calculated as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)
287 was $86.73 \pm 7.86 \mu\text{M TEAC/g}$.

289 **DISCUSSION**

290 The production of reactive oxygen species and an imbalance of the cellular oxidative status have been
291 related to the initiation and progression of inflammatory processes and administration of antioxidant
292 substances has proven to be useful in the reduction of injury associated with several situations of shock,
293 inflammation and ischemia-reperfusion injury⁽²¹⁾.

294 Lycopene is a carotenoid with known antioxidant properties, and as re-evaluated by the ORAC method
295 in this paper, it revealed a very potent antioxidant capacity ($86.73 \pm 7.86 \mu\text{M TEAC/g}$), higher than the
296 whole tomato ($4.06 \pm 37.76 \mu\text{M TEAC/g}$).

297 Thus, knowing the importance of antioxidant substances on inflammation situations, we aimed to
298 evaluate the anti-inflammatory activity of lycopene. Therefore we evaluated the local anti-
299 inflammatory properties of lycopene on a model of carrageenan-induced paw edema, when acutely and

300 chronically administered, and also the effect of chronically administered lycopene in a model of hepatic
 301 injury caused by ischemia-reperfusion of the liver.

302 Results show that lycopene administration significantly reduced edema formation 6 hours after
 303 induction by intraplantar injection of carrageenan, thus exhibiting local anti-inflammatory effect. This
 304 effect was observed when the administration was performed immediately before induction or by
 305 repeated administration in the 14 days that preceded the experiment. In the acute dosing study, a dose-
 306 response relationship was observed, achieving a maximal effect of 30% of edema reduction at the 50
 307 mg/kg dose. In the repeated dosing study both doses evaluated revealed 30% of edema reduction with
 308 no dose-response relation. This probably reflects that a maximal anti-inflammatory effect is obtained
 309 when lycopene is administered at the tested doses during 14 days.

310 This local acute inflammation model induces a biphasic edema consisting on an early phase (up to 2 h)
 311 followed by a more sustained late phase (2 to 6h). The early phase of carrageenan edema is related to
 312 the production of immediate inflammation mediators like histamine, bradykinin, leukotrienes, platelet-
 313 activating factor and cyclooxygenase products in the inflamed tissue. The late phase is related to
 314 neutrophil infiltration⁽²²⁾ and the production of reactive species such as hydrogen peroxide, superoxide
 315 radical, peroxynitrite⁽²³⁾ and pro-inflammatory prostanoids⁽²⁴⁾.

316 Giving the importance of the oxidative status in the formation of edema, the anti-inflammatory effect
 317 exhibited by lycopene in this model might be related to its anti-oxidant properties.

318 Lycopene also exhibited anti-inflammatory effect in a rat model of liver injury induced by ischemia-
 319 reperfusion in which administration of lycopene during 14 days led to a reduction of liver injury. The
 320 increase in the serum levels of AST and ALT induced by I/R was significantly attenuated by pre-
 321 treatment with lycopene and γ -GT serum levels in lycopene-treated rats were not significantly different
 322 from sham-operated rats (not subjected to I/R).

323 Measurement of the tissue levels malondialdehyde (MDA) revealed that I/R injury increases MDA
 324 production, a consequence of an increase in lipid peroxidation. Liver samples from lycopene-treated
 325 rats exhibited lower levels of tissue MDA than rats subjected only to I/R. This indicates that lipid
 326 peroxidation of the liver tissue was reduced on the pretreated organs subjected to I/R.

327 This suggests that the beneficial effect of lycopene on the reduction of liver injury might be related to
 328 its antioxidant properties.

329 Ischemia-reperfusion injury occurs in a number of clinical settings, including liver surgery,
 330 transplantation, and hemorrhagic shock with subsequent fluid resuscitation, leading to significant
 331 morbidity and mortality. The mechanism underlying ischemia-reperfusion damage to liver is likely to
 332 be a multi-factor phenomenon involving a complex interaction between different mechanisms such as

endothelial cell activation, vasoconstriction, the activation of Kupffer cells and neutrophils that produce pro-inflammatory mediators such as reactive species. The reactive species produced in liver ischemia-reperfusion are one of the elements responsible for the worsening of cellular damage found in this model^(19,25). The administration of antioxidant therapy has been proposed as a new pharmacological tool in the reduction of the damage caused by reactive species in ischemia-reperfusion situations⁽²⁶⁾. Sepodes *et al* confirmed this beneficial antioxidant effect using TEMPOL, an intracellular free radical scavenger. In that study, TEMPOL limited the damage provoked by liver ischemia-reperfusion injury, improving liver function and resistance to injury⁽¹³⁾.

The improvement on hepatic function markers in ischemia-reperfusion conditions by lycopene is in agreement with the other ischemia-reperfusion damage model. In the myocardial ischemia-reperfusion model, the early intervention with lycopene resulted in the preservation of the myocardial antioxidant status; it reduced the lipid peroxidation induced by this model and produced a reduction of myocardial damage⁽¹²⁾.

We also evaluated the systemic toxicity of lycopene at the doses of 25 mg/kg/day and 50 mg/kg/day during 14 days. Serum levels of biomarkers for organ injury were evaluated. No significant difference was observed between lycopene-treated and control groups, indicating that lycopene administration during 14 days did not led to kidney, liver or pancreatic injury (Table 1). This is in agreement with other studies in which lycopene was considered to have a relatively large margin of safety with an absence of toxic effects in long term administration of higher doses⁽²⁷⁾.

In conclusion, our results show for the first time that lycopene exhibits local anti-inflammatory activity in the carrageenan-induced paw edema model and attenuates liver injury induced by ischemia-reperfusion, which appears to be related to its antioxidant properties.

Therefore, lycopene administration might be useful in the management of inflammatory processes and further research on anti-inflammatory carotenoids might lead to the discovery of new pharmacological tools in the treatment of inflammatory diseases.

To conclude, this study means to show that, apart from its nutritional character, lycopene showed anti-inflammatory activity and reduced liver injury induced by I/R. This nutrient might be useful in the prophylaxis of current damage caused by inflammatory processes and this protection is evident when lycopene is administrated chronically, suggesting that the regular consumption of lycopene-rich products (such as tomatoes and their products) might help limiting inflammatory damages and improves health.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Cláudia Fernandes for the outstanding assistance during this study. DSM Nutritional Products for supplying Redivivo™. Clínica Medica e Diagnóstico, Dr Joaquim Chaves (Miraflores, Algés, Portugal), for the remarkable technical assistance during this study. Leticia Maria Bignotto was supported by a grant from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES)*.

There is no any conflict of interest in this manuscript.

The contribution of each author to the manuscript was: L. M. Bignotto and J. Rocha contributed for study design, data collection and interpretation, statistical analysis, manuscript preparation and literature search. B. Sepodes contributed for study design, data collection and interpretation, statistical analysis, manuscript preparation and fund collection. M. Eduardo-Figueira contributed for data collection, data interpretation, and manuscript preparation. R. Pinto contributed for data collection. M.V. Chaud, J.E. de Carvalho and H. Moreno Jr contributed for data interpretation and fund collection. H. Mota-Filipe contributed for study design, data interpretation, manuscript preparation, literature search and fund collection.

REFERENCES

- 1- Canene-Adams K, Campbell JK, Zaripheh S *et al.* (2005) The tomato as a functional food. *J Nutr* **135**, 1226–1230.
- 2- Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB *et al.* (1995) Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* **87**, 1767-76
- 3- Giovannucci E (2005) Tomato products, lycopene, and prostate cancer: a review of the epidemiological literature. *J Nutr* **135**, 2030S-1S
- 4- Blum A, Monir M, Wirsansky I *et al.* (2005) The beneficial effects of tomatoes. *Eur J Intern Med* **16**, 402-4.
- 5- Saganuma H & Inakuma T (1999) Protective effect of dietary tomato against endothelial dysfunction in hypercholesterolemic mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 78-82.
- 6- Clinton SK (1998) Lycopene: chemistry, biology and implications for human health and disease. *Nutr Rev* **56**, 35-51.
- 7- Arab L & Steck S (2000) Lycopene and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* **71**, Suppl.6, S1691-S1695.
- 8- Di Mascio P, Kaiser S & Sies H (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* **274**, 532-538.

- 398 9- Sies H & Stahl W (1995) Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants.
399 *Am J Clin Nutr* **62**, 1315S-1321S.
- 400 10- Heber D, Lu QY (2002) Overview of mechanisms of action of lycopene. *Exp Biol Med (Maywood)*
401 **227**, 920-3.
- 402 11- Reifen R, Nissenkorn A, Matas Z and Yoram Bujanover (2004) 5-ASA and lycopene decrease the
403 oxidative stress and inflammation induced by iron in rats with colitis *J Gastroenterol.* **39**, 514-9.
- 404 12- Bansal P, Gupta SK, Ojha SK, Nandave M, Mittal R, Kumari S, Arya DS. (2006) Cardioprotective
405 effect of lycopene in the experimental model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell*
406 *Biochem.* **289**, 1-9.
- 407 13- Sepodes B, Maio R, Pinto R *et al.* Tempol, an intracellular free radical scavenger, reduces liver
408 injury in hepatic ischemia-reperfusion in the rat (2004) *Transplant Proc.* **36**, 849-53.
- 409 14- Bonta IL & Bult H (1977) Effects of anti-inflammatory drugs on the carrageenin-induced hind paw
410 inflammation of rats deprived of endogenous precursors of prostaglandins. *Agents Actions Suppl.* **2**, 77-
411 83
- 412 15- Wu Y, Zhou C, Song L *et al.* (2006) Effect of total phenolics from *Laggera alata* on acute and
413 chronic inflammation models. *J Ethnopharmacol* **108**, 243-250.
- 414 16- Mota-Filipe H, Sepodes B, McDonald MC, Cuzzocrea S, Pinto R, Thiemermann C. (2002) The
415 novel PARP inhibitor 5-aminoisoquinolinone reduces the liver injury caused by ischemia and
416 reperfusion in the rat. *Med Sci Monit.* **8**, BR444-53.
- 417 17- Moussa ME, Sarraf CE, Uemoto S, Sawada H, Habib NA. Effect of total hepatic vascular exclusion
418 during liver resection on hepatic ultrastructure. (1996) *Liver Transpl Surg.* **2**, 461-7.
- 419 18- Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. (2001) Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg.*
420 **181**, 160-6.
- 421 19- Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. The role of
422 cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. (1996)
423 *Hepatology* **23**, 506-14.
- 424 20- Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M *et al.* Up-regulation of oxygen-derived free radicals by
425 interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. (1997) *Transplantation.* **64**, 1398-403.
- 426 21- Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological
427 approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. (2001) *Pharmacol Rev.* **53**, 135-59.
- 428 22- Di Rosa M, Giroud JP & Willoughby DA (1971) Studies on the mediators of the acute
429 inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol* **104**,
430 15-29.

- 431 23- Khattab MM (2006) Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite-
432 and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: a key role for
433 superoxide anion. *Eur J Pharmacol* **548**, 167-73.
- 434 24- Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P *et al.* (1998) Antiinflammatory effects of
435 mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in
436 carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic Biol Med* **24**, 450-459.
- 437 25- de Groot H & Rauen U (2007) Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a
438 review. *Transplant Proc* **39**, 481-484
- 439 26- Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W *et al.* (2005) The contemporary role of antioxidant
440 therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. *Liver Transpl* **11**, 1031-1047.
- 441 27- Michael McClain R, Bausch J. Summary of safety studies conducted with synthetic lycopene.
442 (2003) *Regul Toxicol Pharmacol.* **37**:274-85.

Certificado de aprovação do Comitê de ética em experimentação animal CEEA/UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

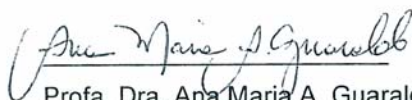
CERTIFICADO

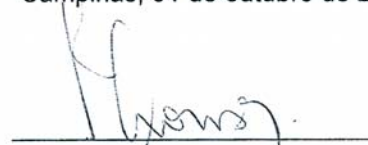
Certificamos que o Protocolo nº 1375-1, sobre "Avaliação do efeito do licopeno nas alterações cardiovasculares funcionais induzidas pela inibição crônica da síntese de óxido nítrico e em modelos de inflamação aguda", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior / Letícia Maria Bignotto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 31 de outubro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1375-1, entitled "Effects of the lycopene in the functional cardiovascular alterations induced by the chronic inhibition of the synthesis of nitric oxide and in experimental models of the acute inflammation", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on October 31, 2007.

Campinas, 31 de outubro de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alenso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>