

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA – PPGBTOX**

**EFEITO *IN VITRO* DO POLIMORFISMO ALA16VAL
DO GENE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE
DEPENDENTE DE MANGANÊS NO METABOLISMO
OXIDATIVO DE LINFÓCITOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GREICE FRANCIELE FEYH DOS SANTOS MONTAGNER

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**EFEITO *IN VITRO* DO POLIMORFISMO ALA16VAL DO
GENE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE DEPENDENTE DE
MANGANÊS NO METABOLISMO OXIDATIVO DE
LINFÓCITOS**

por

GREICE FRANCIELE FEYH DOS SANTOS MONTAGNER

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas, Área de concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado:

**EFEITO *IN VITRO* DO POLIMORFISMO ALA16VAL DO GENE DA
SUPERÓXIDO DISMUTASE DEPENDENTE DE MANGANÊS NO
METABOLISMO OXIDATIVO DE LINFÓCITOS**

elaborada por
Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dr^a. (UFSM)

Luiz Carlos Rodrigues Junior, Dr. (UNIFRA)

Santa Maria, 05 de março de 2010.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelos meus objetivos já alcançados e por estar sempre iluminando o meu caminho.

Ao meu esposo Eduardo, por seu amor, dedicação, incentivo, compreensão nos dias de ausência, e por sempre estar ao meu lado me apoiando nos momentos em que eu mais precisei.

À minha família, em especial aos meus pais, Enio e Marelei, pelo carinho e incentivo depositados em mim desde o princípio.

À minha orientadora Prof^a Ivana, pela oportunidade, pelo esforço dedicado, pela confiança, pela amizade, pela paciência e por todos os ensinamentos transmitidos. A você, quero expressar toda minha gratidão e admiração pela pessoa que és e pelo exemplo de dedicação a pesquisa.

À minha grande amiga Fernanda Lima, que está presente em minha vida desde a graduação. Agradeço por sua amizade verdadeira e pela ajuda imprescindível e incansável em todos os momentos.

A toda a equipe do laboratório de Biogenônica que contribuiu para a execução da parte experimental deste trabalho, em especial a Prof^a Maria Izabel e aos colegas de pós-graduação Maria Fernanda, Michel, Thaís e Clarice.

A Prof^a Msc. Michele Sagrillo, pelo inestimável apoio fora da UFSM.

A Msc. Marta Duarte, pelo auxílio nas coletas das amostras.

À Universidade Federal de Santa Maria, referência em qualidade pela formação acadêmica.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A CAPES pela concessão de recursos a pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, pelo alto nível de seus docentes e discentes na produção científica.

A todos os demais amigos e pessoas que não foram citadas, mas que de alguma forma foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria (RS, Brasil)

EFEITO *IN VITRO* DO POLIMORFISMO ALA16VAL DO GENE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE DEPENDENTE DE MANGANÊS NO METABOLISMO OXIDATIVO DE LINFÓCITOS

AUTORA: Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, 05 de março de 2010

Estudos epidemiológicos sugerem que o desbalanço na atividade de enzimas antioxidantes, geneticamente causado, aumenta o risco de disfunções metabólicas e doenças crônicas não-transmissíveis. Este é o caso do polimorfismo em que ocorre uma troca da Alanina (A) por uma Valina (V) no códon 16 do gene da enzima superóxido dismutase dependente de manganês (Ala16Val-SOD2). O alelo A possui uma eficiência de catálise maior do que o alelo V. Entretanto, esta maior eficiência aumenta os níveis de H₂O₂ levando a um conseqüente desbalanço oxidativo que, por sua vez, aumenta o risco de neoplasias. Por outro lado, o alelo V que apresenta uma SOD2 menos eficiente está associado a disfunções endoteliais e cardiometabólicas. Portanto, este polimorfismo serve como modelo *in vitro* para análises de respostas diferenciais a agentes pró e antioxidantes. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi investigar a resposta *in vitro* de cultura de linfócitos com diferentes genótipos (AA, VV e AV), provenientes de indivíduos saudáveis, expostas a radiação ultravioleta (UV) que é um fator pró-oxidante. Antes e após exposição, foram analisados os efeitos citotóxicos (viabilidade celular e índice mitótico), indicadores do metabolismo oxidativo (peroxidação lipídica, atividade enzimática da SOD, catalase, grupos tióis, polifenóis totais e de ácido ascórbico) e efeitos genotóxicos (dano de DNA pelo Ensaio Cometa e instabilidade cromossômica,). Os resultados mostraram que as células portadoras do genótipo AA apresentaram maior viabilidade celular e índice mitótico. Entretanto, após a exposição UV tal viabilidade foi similar entre os genótipos. Em condições basais níveis elevados de SOD e polifenóis totais plasmáticos foram observados no genótipo AA em relação ao genótipo VV. Porém, linfócitos AA apresentaram maior índice de danos no DNA na presença da radiação UV. Estes resultados sugerem que o polimorfismo Ala16Val-SOD2 pode afetar diferencialmente a toxicidade a fatores como a radiação UV.

Palavras-chave: polimorfismo Ala16Val, metabolismo oxidativo, dano no DNA, radiação ultravioleta, cultura de linfócitos

ABSTRACT

Master Dissertation

Post Graduate Course on Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Federal University of Santa Maria (RS, Brazil)

IN VITRO EFFECT OF ALA16VAL POLIMORPHISM OG SUPEROXIDE DISMUTASE ENZYME MANGANESE DEPENDENTE IN OXIDATIVE METABOLISM OF LINPHOCYTES

AUTOR: Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner

ADVISER: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, march 05, 2010.

Epidemiological studies suggest that the imbalance in antioxidant enzymes activity genetically caused, increases the risk of metabolic disorders and chronic non-communicable diseases. This is the case of polymorphism that occurs in an substitution of Alanine (A) by a Valine (V) at codon 16 of the gene for superoxide dismutase manganese-dependent (Ala16Val-SOD2). The A allele has a higher efficiency of catalysis than allele V. However, this efficiency increases the levels of H₂O₂ leading to a consequent oxidative imbalance that, in turn, increases the risk of cancer. Furthermore, the V allele that presents a smaller efficiency SOD2 is associated with endothelial dysfunction and cardiometabolic. Therefore, Ala16VAL-SOD2 polymorphism serves as a model for in vitro analysis of differential responses to pro and antioxidants factors. The objective of this study was to investigate the in vitro response of lymphocytes culture with different genotypes (AA, VV and AV) from healthy subjects exposed to ultraviolet (UV) is a pro-oxidant factor. In lymphocyte not exposed and UV exposed it was analyzed the cytotoxic variables (cell viability, mitotic index), biomarkers of oxidative metabolism (lipid peroxidation, enzymatic activity of SOD, catalase, thiol groups, protein carbonylation, total polyphenols and ascorbic acid) and genotoxic effects (by Comet Assay and chromosomal instability). The results showed that cells carrying the AA genotype had higher cell viability and mitotic index. However, after UV exposure such viability was similar between genotypes. At baseline levels higher SOD and total polyphenol levels were observed in AA genotype when compared to the VV genotype. However, lymphocytes AA had higher rates of DNA damage in the presence of UV radiation. These results suggest that the polymorphism Ala16Val-SOD2 may differentially affect the toxicity factors such as UV radiation.

Keywords: A16V-SOD2 polymorphism, oxidative metabolism, DNA damage, ultraviolet radiation, lymphocyte culture

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVO	10
2.1 GERAL	10
2.2 ESPECÍFICOS.....	10
3 REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS.....	11
3.1.1 <i>Conceito de Radicais Livres e Espécies Reativas</i>	11
3.1.2 <i>Produção de Radicais Livres e Espécies Reativas</i>	11
3.1.3 <i>Sistema de defesa antioxidante</i>	15
3.1.4 <i>Estresse oxidativo e danos celulares</i>	22
3.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA ENZIMA SOD2	26
4 RESULTADOS.....	29
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
7 PERSPECTIVAS.....	60
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1 INTRODUÇÃO

Existe um grande corpo de evidências que o estresse oxidativo causado pelo aumento nas moléculas de espécies reativas de oxigênio (EROs) está relacionado com doenças crônicas não-transmissíveis incluindo as neoplasias, as morbidades cardiovasculares e neurodegenerativas entre outras. Por este motivo estudos relacionados à produção e catálise destas moléculas no organismo são de grande interesse.

Em termos biológicos sabe-se que existe uma constante produção pelo metabolismo aeróbico de pequenas quantias de espécies reativas de oxigênio incluindo o ânion superóxido (O_2^-) (EMERIT 1994).

Por serem moléculas de grande reatividade o organismo possui dois sistemas antioxidantes (endógeno e exógeno). O sistema endógeno se constitui por uma cadeia enzimática que tem como produto final a produção de água a partir da catálise do O_2^- . Por este motivo este sistema é conhecido como sistema antioxidante enzimático. O sistema exógeno é constituído por uma série de moléculas bioativas com atividade antioxidante que são obtidas a partir da alimentação.

Uma vez que a maior produção de radicais livres ocorre na mitocôndria como um subproduto da respiração celular e que a principal ERO produzida é o radical O_2^- o sistema antioxidante enzimático na mitocôndria ocorre via ação sucessiva das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (OBERLEY 1982; WISEMAN et al., 1996; NOMURA et al., 2001). No caso, a SOD dismuta o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Existem três tipos distintos de SOD: SOD1 e SOD3 que, para funcionarem são dependentes dos co-fatores cobre e zinco e a SOD2 que necessita do co-fator manganês. Cada uma destas isoenzimas é produzida a partir de diferentes genes localizados no DNA nuclear (McCORD et al., 1969; WEISIGER et al., 1973; MARKLUND 1992).

Apesar das três enzimas serem muito importantes para a função celular a enzima SOD2 tem um papel destacado uma vez que atua dentro da mitocôndria onde ocorre a maior produção do anion O_2^- . Uma vez produzido o H_2O_2 , esta molécula serve de substrato para a glutathiona peroxidase que o transforma em água.

A enzima catalase também age sobre o peróxido de hidrogênio transformando-o em água. Porém, tal enzima é comum no citoplasma e em outros compartimentos celulares (WALLACE 1999), contudo não está presente na mitocôndria, onde temos a ação da SOD2.

O desbalanço entre a produção e a degradação de EROs denomina-se estresse oxidativo. No caso tal desbalanço pode ocorrer tanto por fatores genéticos quanto ambientais. Um polimorfismo no gene da enzima SOD2 (Ala16Val-SOD2) descrito na década de 90 em seres humanos parece agir sobre a eficiência desta enzima podendo levar ao acúmulo ou do ânion O_2^- ou da molécula H_2O_2 . Em ambos os casos um desbalanço oxidativo ocorre. Tal desbalanço geneticamente causado parece estar associado a doenças crônicas não-transmissíveis como o câncer de mama (AMBROSONE et al., 1999) e próstata (WOODSON et al., 2003), disfunção endotelial (Kakko et al., 2003), imunosenescência (TAUFER et al., 2003), obesidade (Montano et al., 2009) conforme o genótipo.

Por este motivo, este polimorfismo poderia servir como um modelo para o entendimento dos processos regulatórios mais específicos relacionados à dinâmica do estresse oxidativo, a gênese das doenças crônico-degenerativas associadas, bem como para a análise de possíveis efeitos nutrigenéticos e farmacogenéticos de interesse clínico e epidemiológico.

Portanto, estudos complementares incluindo a análise *in vitro* de indicadores do metabolismo oxidativo em células com diferentes genótipos deste polimorfismo expostas a agentes pró-oxidantes podem auxiliar na elucidação dos mecanismos associados ao desbalanço genético da enzima superóxido dismutase que aumenta o risco de disfunções e doenças.

Esta é a principal questão abordada no estudo aqui apresentado.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Investigar a resposta *in vitro* de indicadores celulares, bioquímicos e genotóxicos do metabolismo oxidativo em cultura de células oriundas de indivíduos com diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val da enzima superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2) submetidas à radiação ultravioleta.

2.2 Específicos

Em cultura de linfócitos de indivíduos saudáveis, com diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val do gene da SOD2, com ou sem exposição à radiação ultravioleta analisar a ocorrência da resposta diferencial de:

- indicadores celulares (taxa de proliferação e viabilidade celular);
- indicadores bioquímicos do metabolismo oxidativo através da avaliação dos níveis de peroxidação lipídica, grupos tióis, polifenóis totais, vitamina C e dos níveis das enzimas superóxido dismutase e catalase;
- indicadores de genotoxicidade (dano de DNA por ensaio Cometa e instabilidade cromossômica).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Radicais Livres e Espécies Reativas

3.1.1 Conceito de Radicais Livres e Espécies Reativas

Os radicais livres são espécies químicas que apresentam um elétron desemparelhado na última camada (ÇIMEN 2008). Podem ser formados pela adição ou perda de um elétron de uma substância não-radical. Entretanto, existem compostos igualmente reativos que não possuem elétron desemparelhado, não sendo classificados quimicamente como radicais livres, mas são designados de maneira mais ampla como EROS ou de Nitrogênio (ERNs). EROs podem ser gerados tanto de forma endógena quanto exógena.

3.1.2 Produção de Radicais Livres e Espécies Reativas

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, as EROs são produzidas naturalmente e também quando ocorre alguma disfunção biológica (VALKO et al., 2006). Endogenamente as EROs são produzidas principalmente pelo sistema de transporte de elétrons mitocondrial, onde o oxigênio precisa receber quatro elétrons para ser reduzido a água (Figura 1).

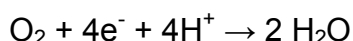


Figura 1: Redução tetravalente do oxigênio

No entanto, essa redução pode ser parcial, e como consequência ocorre a formação de intermediários altamente tóxicos tais como: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}) (Figura 2) (SCANDALIOS 2005). As principais características desses EROs são a alta reatividade e a meia vida curta (Tabela 1).

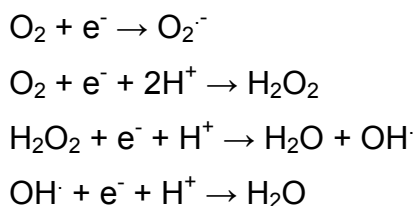


Figura 2: Redução parcial do oxigênio

Tabela 1: Principais características do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (ISIDÓRIO et al., 2008, VASCONCELOS et al., 2007).

Nome	Símbolo	Características	Tempo de vida
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Espécie pouco reativa, porém muito tóxica. Gerado continuamente por diversos processos celulares (cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microssomo, através de enzimas como a xantina oxidase e o NADPH oxidase). Fraca ação oxidante e forte redutor.	10^{-6} segundos
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Substância altamente hidrossolúvel que penetra facilmente na célula e possui alta estabilidade. Age como precursor para a formação de outros radicais livres. É um fraco agente oxidante e um fraco agente redutor, reage lentamente com tióis, com sais de ferro e cobre reduzidos, com proteínas heme e peroxidases para iniciar reações radicalares e peroxidações lipídicas.	10^{-2} segundos
Hidroxila	OH^{\cdot}	Formado da reação do superóxido com peróxido de hidrogênio na presença de metais de transição principalmente ferro e cobre, demonstrada pela reação de Fenton. É o mais reativo e mais lesivo radical conhecido e para o qual, uma vez formado, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa, reage com uma série de endobióticos, causa modificação no DNA (com modificação das bases e quebras das fitas), danos as proteínas, inativação enzimática e peroxidação lipídica.	10^{-9} segundos

O H₂O₂ produzido a partir da catálise do O₂^{•-} e de outras reações metabólicas pode reagir com íons cobre (Cu⁺) ou ferro (Fe²⁺) que estão presentes no meio celular formando o radical OH[•]. Essa reação é conhecida como reação de Fenton (Figura 3) (BERRA 2006).

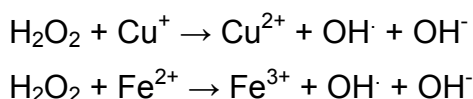


Figura 3: Reação de Fenton

Além disso, os metais de transição como o cobre II (Cu²⁺) ou ferro III (Fe³⁺) podem catalisar a reação entre o H₂O₂ e o O₂^{•-} formando OH[•]. Essa reação é conhecida como reação de Haber-Weiss (Figura 4) (BERRA 2006).

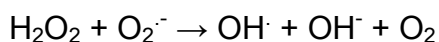


Figura 4: Reação de Haber-Weiss

É importante salientar que a produção de EROs nem sempre é consequência do metabolismo aeróbio, podendo ser gerada também pelas oxidases (enzimas específicas da membrana plasmática) como resposta a fatores de crescimento e citocinas e, conseqüentemente, podem servir como segundo mensageiro em alguns processos específicos de sinalização celular e regulação gênica. Ou seja, moléculas de EROs nem sempre são negativas ao organismo já que podem funcionar como agentes reguladores e moduladores em diversas rotas fisiológicas (BARZILAI et al.,2004).

3.1.2.1 Fontes exógenas de EROs

Os fatores ambientais também podem levar a um aumento na produção de EROS o que pode, potencialmente, produzir um estado de estresse oxidativo. As fontes exógenas de EROs incluem luz ultravioleta, radiação ionizante e agentes químicos (BERRA 2006). Assim, estas variáveis podem ser genericamente denominadas de fatores pró-oxidantes.

2.1.2.1.1 Radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta A (UVA, $\lambda=400-320\text{nm}$), a qual corresponde a 90% da luz solar, penetra pela pele de forma cumulativa e associada com o efeito da radiação ultravioleta B (UVB, $\lambda=320-290\text{nm}$) facilita a degeneração do colágeno dermal, podendo causar inflamação na pele e envelhecimento precoce (MENA 2009). A radiação UVA possui efeito genotóxico, ligada ao aparecimento de aberrações cromossômicas causadas por quebras nas fitas de DNA (WISCHERMANN et al., 2008).

A radiação UVB aumenta a produção de EROs nas células epidérmicas e ativa as vias de sinalização envolvidas na regulação do crescimento celular, a proliferação e deste modo facilita a expansão clonal das células tumorais (ZHANG et al., 2005).

A radiação ultravioleta C (UVC, $\lambda=290-200\text{nm}$) possui maior energia que as anteriores, uma vez que possui menor comprimento de onda. Seus efeitos são mais marcantes, pois possui maior potencial de dano à pele, porém não atravessa a camada de ozônio. Geralmente lâmpadas UVC são muito utilizadas como germicidas (SGARBI et al., 2007).

Como foi anteriormente comentado, a fim de minimizar os efeitos danosos das EROs, os organismos aeróbicos possuem dois sistemas de defesa antioxidantes, o sistema endógeno (enzimático) e o sistema exógeno (não-enzimático).

3.1.3 Sistema de defesa antioxidante

3.1.3.1 Sistema de defesa endógeno (enzimático)

O sistema enzimático é constituído principalmente pela ação das enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) que atuam diretamente sobre o radical superóxido e sobre o peróxido de hidrogênio convertendo-os em espécies menos reativas (Scandalios 2005). A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (Figura 5), a CAT reduz o H_2O_2 em água e oxigênio (Figura 6), enquanto que a glutaciona peroxidase reduz o H_2O_2 pela reação com a glutaciona reduzida (GSH) em água e glutaciona oxidada (GSSG) e em seguida a glutaciona oxidada é reconvertida em glutaciona reduzida pela ação da glutaciona redutase (GRd) (Figura 7) (VASCONCELOS et al., 2007).

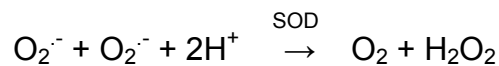


Figura 5: Dismutação do radical superóxido pela ação da SOD

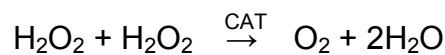


Figura 6: Redução do peróxido de hidrogênio pela ação da CAT

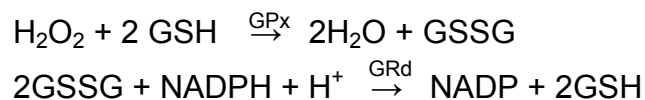


Figura 7: Redução do peróxido de hidrogênio pela ação da GPx

3.1.3.1.1 Superóxido dismutase

A SOD (EC 1.15.1.1) é responsável pela dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e é degradado por outras enzimas. Existem três tipos de SOD, classificadas de acordo com o íon que contém no seu sítio ativo:

- 1) SOD1 dependente de cobre e zinco (Cu/Zn-SOD): é encontrada no citosol de células eucarióticas, mais particularmente nos lisossomas e no núcleo, nos cloroplastos e em alguns procariotos (CEMELI et al., 2009).
- 2) SOD2 dependente de manganês (MnSOD): é encontrada em procariotos e na mitocôndria de leveduras e animais (SCANDALIOS et al., 2005).
- 3) SOD3 dependente de cobre e zinco (Cu-ZnSOD): é geralmente encontrada no meio extracelular (ZELKO et al., 2002).

A reação de dismutação do superóxido acontece espontaneamente em condições fisiológicas, porém quando catalisada pela SOD, a sua velocidade é 10^4 vezes maior (CHANCE et al., 1979).

3.1.3.1.2 Catalase

A catalase (EC 1.11.1.6) é uma das enzimas mais ativas produzidas pela natureza (CATAPTANO 1997). Esta enzima é abundante no interior do peroxissoma, que é a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, fonte inesgotável de peróxidos orgânicos e produtos carbonílicos. A catalase é, também, encontrada nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco (VASCONCELOS et al., 2007).

A catalase é responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio em uma velocidade extremamente rápida, correspondendo a uma atividade no centro catalítico de aproximadamente 10^7 min^{-1} . Esta enzima é a principal reguladora dos níveis intracelulares de peróxido de hidrogênio, e quando sua atividade está inibida há um aumento da concentração de peróxido de hidrogênio em órgãos como o fígado (SCANDALIOS et al., 2005).

3.1.3.1.3 Glutathione Peroxidase

A enzima glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) também degrada moléculas de peróxido de hidrogênio em água. É amplamente distribuída nos tecidos humanos e animais, sendo produzida em grande quantidade nos rins, fígado e sangue total, em nível moderado nos eritrócitos e em baixos níveis no plasma sanguíneo (HALLIWELL et al., 1999). Apresenta-se sob quatro isoformas: GPx1 ou enzima clássica, encontrada no citosol de todas as células do corpo; GPx2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal; GPx3 ou plasmática ou extracelular, encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos, e a GPx4, que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, reduzindo, também, o hidroperóxido da timina, formado como consequência do ataque dos radicais a base timina do DNA (VASCONCELOS et al., 2007; RAYMAN 2000).

Possui uma importante característica estrutural, pois apresenta um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima, sendo este o principal componente para a sua atividade (ROVER JÚNIOR et al., 2001). Assim, no caso de deficiência do cofator selênio no organismo ocorre uma diminuição da atividade da GPx em sua forma reduzida, e tal deficiência pode ser associada com importantes alterações no metabolismo celular (IP et al., 1997; FOSTER et al., 1997).

Outra enzima que age conjuntamente com a glutathione peroxidase é a enzima glutathione redutase, que é a responsável pela regeneração da glutathione à sua forma reduzida na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), impedindo a paralisação do ciclo metabólico da glutathione (ROVER JÚNIOR et al., 2001).

3.1.3.2 Sistema de defesa exógeno (não-enzimático)

Os alimentos vegetais possuem uma ampla gama de compostos secundários com ação antioxidante. Por este motivo, os antioxidantes exógenos não enzimáticos,

oriundos da dieta, podem ser divididos em dois tipos: lipofílicos (vitamina E, carotenóides, ubiquinona, melatonina, etc) e hidrofílicos (vitamina C, glutatona, ácido úrico, etc).

3.1.3.2.1 Vitamina C ou ácido ascórbico

O ácido ascórbico ou vitamina C é comumente encontrado no nosso organismo na forma de ascorbato, que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um $H\bullet$ ou $[H^+ + e^-]$ para um radical (VASCONCELOS et al., 2007). Por ser muito solúvel em água, está localizado nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos.

O ascorbato desempenha papéis fundamentais no organismo, atuando eficientemente sobre o ânion radical superóxido ($O_2\bullet^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH\bullet$) entre outros. Sua oxidação produz inicialmente o radical semidesidroascorbato, que é pouco reativo. Este radical pode ser reconvertido em ascorbato, ou duas moléculas dele podem sofrer desproporcionamento originando uma molécula de desidroascorbato e regenerando uma molécula de ascorbato. O desidroascorbato pode então ser regenerado para ascorbato através de um sistema enzimático, ou pode ser oxidado irreversivelmente gerando oxalato e treonato (Figura 8) (BARREIROS et al., 2006).

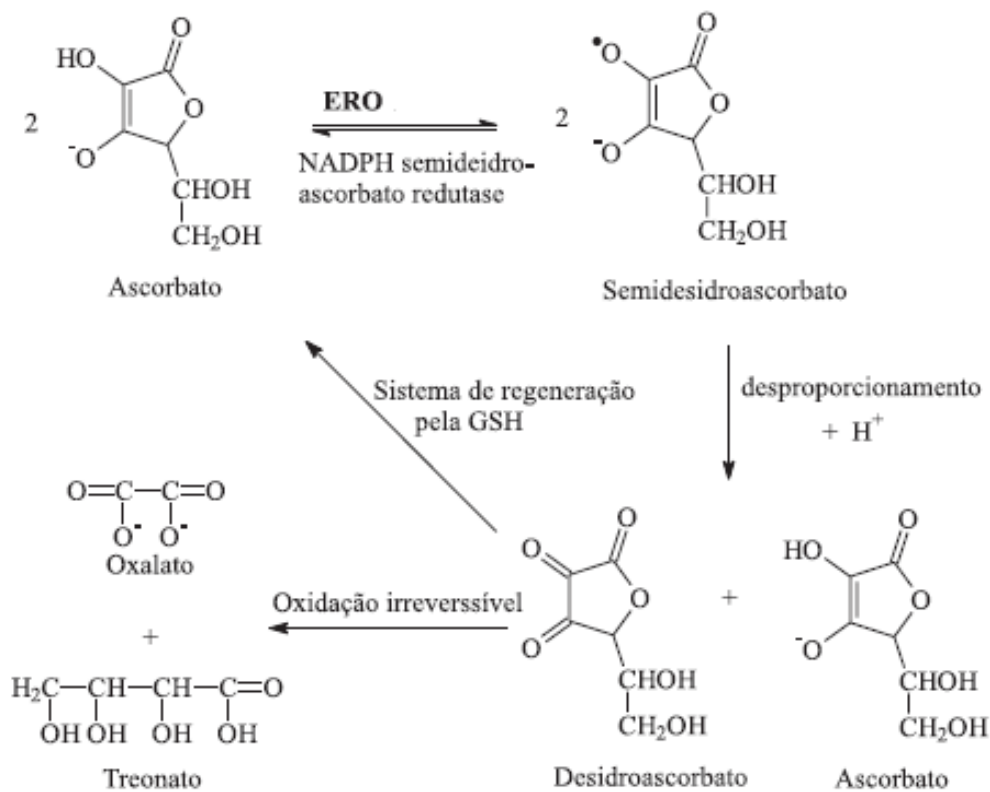


Figura 8: Ciclo oxidativo do ascorbato (BARREIROS et al., 2006). O ascorbato é oxidado a radical semidesidroascorbato, que por sua vez pode ser reconvertido em ascorbato ou sofrer desproporcionamento originando desidroascorbato e ascorbato. O desidroascorbato pode ser regenerado a ascorbato ou ser oxidado irreversivelmente formando treonato e oxalato.

3.1.3.2.2 Glutaciona

A glutaciona (GSH) ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$) é um tripeptídeo (*L*- γ -glutamil-*L*-cisteinilglicina) (Figura 9) que exerce funções essenciais na célula, destacando-se sua função como co-fator da família de enzimas glutaciona peroxidases (GPx), em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a dissulfeto da glutaciona (GSSG) ($C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$) (VASCONCELOS et al., 2007). Em todos os tipos de células, a glutaciona é o mais importante regulador não-enzimático da homeostase redox intracelular (ÇIMEN 2008).

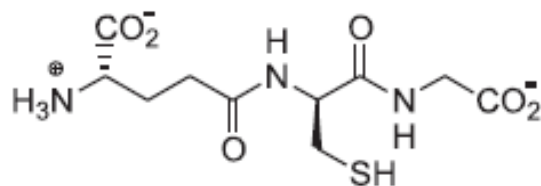


Figura 9: Estrutura química da glutationa

A GSH é abundante no citosol (1 a11 mM), no núcleo (3 a15 mM), e na mitocôndria (5 a11mM) e é o antioxidante mais solúvel nos compartimentos celulares (VALKO et al., 2007). A combinação de sua abundância nos organismos aeróbicos e das propriedades químicas do grupo sulfidril corrrobora com a hipótese de que a GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra EROs e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente em que este vive (HUBER et al., 2008).

3.1.3.2.3 Polifenóis

Os polifenóis são os antioxidantes mais abundantes presentes na dieta, sendo que seu consumo diário pode atingir 1 g. Este consumo é muito maior que ingestão de todos os outros fitoquímicos classificados como antioxidantes (2007; MANACH et al., 2004; CERQUEIRA et al.). De modo geral, os polifenóis e em particular os flavonóides possuem estrutura ideal para o seqüestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E (BARREIROS et al., 2006).

Os flavonóides são sintetizados pelas plantas e possuem estruturas e funções variadas (Figura 11). Dentre os aproximados 4000 flavonóides já descritos, as maiores classes são flavonóis, catequinas ou flavonas, antocianidinas e isoflavonas. Nestas classes há grandes variações estruturais, dependendo do nível de hidrogenação, hidroxilação, metilação e sulfonação das moléculas (CERQUEIRA et al., 2007).

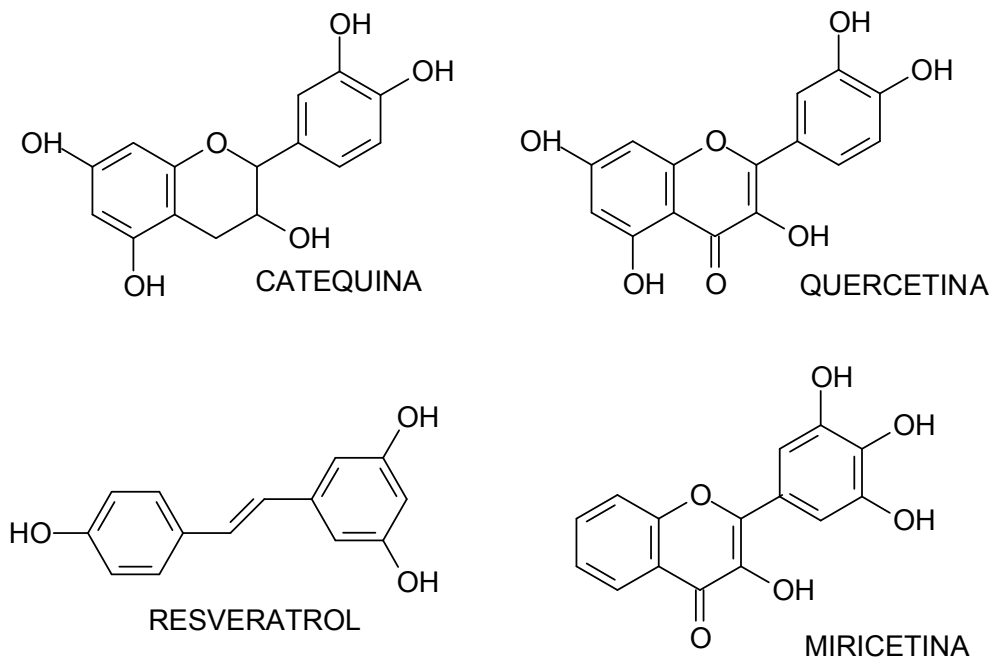


Figura 11: Estrutura dos principais flavonóides

A atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores (WALLE 2004; CERQUEIRA et al., 2007):

(1) Reatividade como agente doador de H e elétrons: Quanto menor o potencial de oxidação do flavonóide, maior é sua atividade como seqüestrador de radicais livres (RICE-EVANS et al., 1997) e quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons (CAO et al., 1997).

(2) Estabilidade do radical flavanoil formado: A estabilidade do radical livre flavanoil formado depende da habilidade do flavonóide em deslocar o elétron desemparelhado. A presença de hidroxilas na posição orto é o principal fator que auxilia nessa deslocalização (CERQUEIRA et al., 2007).

(3) Reatividade frente a outros antioxidantes: Os flavonóides com múltiplas hidroxilas como a miricetina e a quercetina possuem forte atividade antioxidante quando comparados ao α -tocoferol, ácido ascórbico, β -caroteno, glutathiona, ácido úrico e bilirrubina (CAO et al., 1997; YANG et al., 2001).

(4) Capacidade de quelar metais de transição: A remoção de metais de transição livres no meio biológico é fundamental para a proteção antioxidante do

organismo, visto que esses catalisam as reações de Fenton e de Haber- Weiss (CERQUEIRA et al., 2007).

(5) Solubilidade e interação com as membranas: A lipofilicidade do flavonóide indica a incorporação desta molécula pela membrana, que é alvo da maioria das EROs. Os flavonóides que possuem uma cadeia de açúcares ligada em sua estrutura são muito polares, não sendo assimilados pela membrana, porém, nesta forma eles podem ser armazenados em vesículas, possuindo um tempo maior de permanência no organismo. Os flavonóides que são assimilados pelas membranas exercem a função de moduladores de fluidez. Restringindo essa fluidez os flavonóides geram um impedimento físico para a difusão das ERO, de modo que decresce a cinética das reações responsáveis pelo estresse oxidativo (CERQUEIRA et al., 2007).

3.1.4 Estresse oxidativo e danos celulares

As EROs são necessárias para o funcionamento normal do organismo, sendo produzidas continuamente e neutralizadas pelo sistema antioxidante. Entretanto, quando essas espécies reativas são produzidas em altas concentrações ou quando o sistema antioxidante é deficiente, o aumento dos seus níveis caracteriza um fenômeno conhecido como estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007).

Os maiores níveis de espécies reativas promovem reações com substratos biológicos podendo causar danos em diversas biomoléculas presentes no nosso organismo, incluindo lipídios, carboidratos, proteínas, RNA e DNA, e conseqüentemente afetar a saúde humana. Entretanto, a natureza do dano celular induzido pelas EROs depende do local da formação da EROs (GOETZ et al., 2008).

As principais moléculas suscetíveis as EROs são os lipídios presentes nas membranas celulares, as proteínas e as moléculas de ácido nucléico, em especial o DNA. O estresse oxidativo causado nas membranas é, de um modo geral, conhecido como peroxidação lipídica enquanto o estresse oxidativo causado no DNA é classificado, de modo geral, como genotoxicidade.

3.1.4.1 Peroxidação lipídica

A membrana plasmática é basicamente formada por uma dupla camada lipídica no qual se encontram proteínas integrais e periféricas associadas. As EROs podem prejudicar a função das membranas pela oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados presentes nos lipídios e indiretamente pela inibição da síntese dos lipídios, dessaturação de ácidos graxos ou ativação das lípases (GOETZ et al., 2008). Tanto na membrana plasmática quanto nas membranas subcelulares das organelas que contém altas quantidades de ácidos graxos poliinsaturados a formação de radicais intermediários resulta na peroxidação de ácidos graxos.

O processo da peroxidação lipídica pode ser dividido em três etapas: (i) iniciação, (ii) propagação e (iii) terminação. Essas etapas são representadas pelas seguintes reações, onde L representa o lipídio:

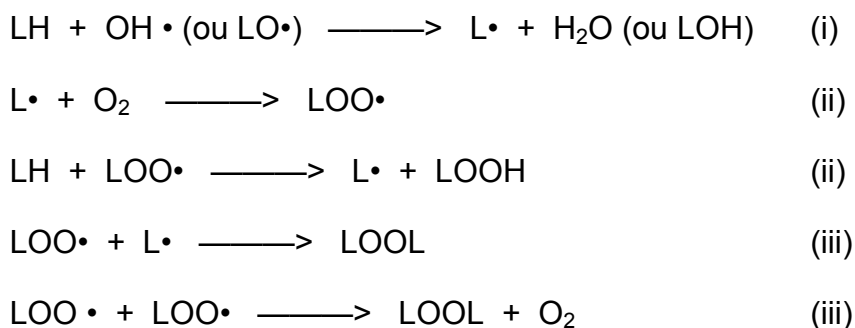


Figura 12: Etapas da peroxidação lipídica (adaptado de FERREIRA et al., 1997). A reação inicia-se com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular. Na primeira equação de propagação, o L· reage rapidamente com o O₂, resultando em LOO· (radical peroxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o L· na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais (L· e LOO·) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem a si próprios.

Após a abstração do átomo de hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) levando à formação de um radical lipídico centrado no carbono (L·), este é estabilizado por um rearranjo molecular, adquirindo a estrutura de dieno conjugado.

A adição extremamente rápida de uma molécula de oxigênio ao radical lipídico leva à formação do radical peróxil (LOO•). Este é capaz de reagir com outro ácido graxo poliinsaturado, iniciando uma nova cadeia de oxidação a partir da formação de outro radical lipídico (L•) (fase de propagação). O radical LOO• combina-se com o átomo de hidrogênio abstraído e forma um hidroperóxido lipídico (LOOH) (LOUREIRO et al., 2002). O término da peroxidação lipídica ocorre quando os radicais (L• e LOO•) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se a si próprios (FERREIRA et al., 1997).

Todas estas modificações oxidativas causam mudanças nas propriedades físicas e químicas das membranas, alterando sua fluidez e permeabilidade, com expansão do líquido intracelular e risco de ruptura tanto da membrana plasmática que circunda a célula quanto das membranas que delimitam as organelas. Estas rupturas levam a morte celular (VASCONCELOS et al., 2007). As reações envolvendo os vários intermediários entre si levam à produção de novos produtos como, por exemplo, o malondialdeído (MDA) que reage com o grupo amina de purinas. Por este motivo, um modo de se averiguar a presença de peroxidação lipídica é através da técnica espectrofotométrica do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (LYKKESFELDT 2007; CATALGOL et al., 2007; JIA et al., 2007; MICALLEFT et al., 2007). A técnica consiste na reação do ácido tiobarbitúrico com o MDA formado em meio ácido que indica a peroxidação lipídica.

3.1.4.2 Carbonilação de proteínas

As proteínas possuem muitos sítios reativos. Sua modificação pode ser induzida por EROs, cátions metálicos (Fe^{2+} , Cu^+), endobióticos (GSH), irradiação, peróxidos lipídicos, oxidoredutases, fármacos, entre outros (VASCONCELOS et al., 2007).

Durante o estresse oxidativo em proteínas, o primeiro evento que ocorre envolve a formação de um radical centrado no carbono por extração de H^\bullet do carbono α em uma ligação peptídica. Em seguida ocorre fragmentação das cadeias e oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos (principalmente os aromáticos),

com produção freqüente de compostos carbonilados, particularmente a partir de resíduos de prolina, arginina e lisina (DALLE-DONE et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2007). Além disso, os grupos carbonila podem ser introduzidos em proteínas via reação com aldeídos derivados da peroxidação lipídica (MDA) ou gerados a partir da reação de redução de açúcar (glicose) ou produtos de sua oxidação com resíduos de lisina (reações de glicação e de glicoxidação formando carboximetil-lisina) (VASCONCELOS et al., 2007, ELLIS 2007).

Segundo ELLIS (2007), o dano causado por aldeídos pode levar à perda da função de proteínas e enzimas, danificar lipídios, e ainda levar à formação de adutos no DNA. Alguns aldeídos podem diminuir os níveis intracelulares de glutathione por meio do aumento do desbalanço oxidante celular. Estas perturbações moleculares podem culminar com a morte celular (ELLIS 2007).

3.1.4.3 Genotoxicidade

A indução de danos oxidativos nas bases do DNA ocorre a partir de sua reação com EROs (GOETZ et al., 2008). Em condições fisiológicas, a quantia absoluta de oxidações no DNA é estimada em aproximadamente uma modificação a cada 130000 nucleotídeos no DNA nuclear. Em compensação, de cada 8000 nucleotídeos um é modificado por EROs no DNA mitocondrial (RICHTER 1992; MARNETT 2000; GOETZ et al., 2008).

As lesões no DNA podem ocorrer devido à oxidação direta dos ácidos nucléicos, ou pela indução de quebras em uma das cadeias do DNA (quebras simples) ou quebras simples em posições aproximadamente simétricas das duas cadeias de DNA (quebras duplas) (BERRA et al., 2006). O surgimento de danos no DNA ocasiona mutações. No caso, as mutações ocorrem como consequência de um erro na sua duplicação, ou seja, a substituição, adição ou eliminação de bases, podendo ocorrer também alterações estruturais das bases nitrogenadas e das desoxirriboses. Outros problemas na molécula de DNA relacionados ao estresse oxidativo incluem o rompimento de pontes de hidrogênio entre duas hélices, a quebra de uma ou das duas cadeias (fitas) de DNA e a formação de ligações cruzadas entre moléculas de DNA e proteínas. Todas estas alterações direta ou

indiretamente influenciam a expressão gênica que pode levar a distúrbios no metabolismo e ao desenvolvimento de doenças (BERRA et al., 2006).

Os organismos vivos possuem a capacidade de reverter estes processos, através de um sistema de reparo do DNA que está presente em todas as células. Entretanto, a perda da capacidade de reparar uma lesão no DNA, tanto por redução da detecção do dano como por deficiência em algum processo enzimático de reparo, é observada em diversas patologias genéticas humanas. Por outro lado, o aumento do estresse oxidativo, mesmo em um organismo com sistema de reparo eficiente leva ao aumento na chance de ocorrência e fixação de mutações pontuais, ou mesmo mutações cromossômicas (numéricas e estruturais) no momento da mitose celular (SAFFI et al., 2003).

Além dos fatores ambientais, variações genéticas presentes nos indivíduos também podem gerar quadros crônicos de estresse oxidativo que aumentam a suscetibilidade dos seus portadores ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis como as neoplasias. Assim, investigações genéticas relacionadas às enzimas do sistema antioxidante têm sido conduzidas, com destaque ao gene da enzima SOD2 (TAUFER et al., 2005).

3.2 Polimorfismos genéticos na enzima SOD2

A enzima SOD2 está entre a primeira linha de defesa antioxidante e é vital para a sobrevivência do organismo como mostram estudos em ratos que tiveram o gene para esta enzima silenciada (knockout) e que morreram ainda no período neonatal (LI et al., 1995).

A enzima SOD2 é produzida a partir de um gene nuclear localizado no cromossomo 6, na sub-região 6q25 (CHURCH et al., 1992; CREAGAN et al., 1993). Uma vez sintetizada no retículo endoplasmático rugoso, a proteína inativa da SOD2 possui uma seqüência peptídica conhecida como seqüência mitocondrial alvo (*mitochondrial target sequence*, MTS) que direciona a proteína SOD2 para o interior da mitocôndria (WOODSON et al., 2003). Dentro desta organela, o segmento peptídico MTS é clivado, e a proteína madura se agrega em uma forma ativa tornando-se funcional (WISPE et al., 1989; SUTTON et al., 2003).

Apesar de ser uma enzima constitutiva, o gene da SOD2 pode ser regulado via indução de diversos fatores incluindo a presença de EROs, determinadas moléculas de citocinas, consumo de álcool e tabaco (KOCH et al., 1994; PERERA et al., 1995; XU et al., 1999).

Um polimorfismo foi identificado na região MTS do gene da SOD2 como resultado de uma substituição de uma valina por uma alanina no aminoácido 9 codificado pelo códon 16. Por este motivo, este polimorfismo é genericamente denominado Ala16Val. Existem assim dois alelos (A, de alanina e V de valina) e três possíveis genótipos: AA, AV e VV. Ou seja, todos os indivíduos da espécie humana possuem um destes três genótipos e transmitem para os seus filhos através dos seus gametas ou o alelo A ou o alelo V (TAUFER et al., 2005).

Em termos fenotípicos a variante Ala-SOD2 possui uma estrutura α -hélice, assim sendo facilmente importada para dentro da mitocôndria. Já a variante Val-SOD2 possui uma estrutura parcial de β -lâmina, o que faz com que fique parcialmente retida no poro da membrana interna mitocondrial. Esta condição faz com que parte da enzima seja degradada, resultando numa variante com menor atividade da enzima (SUTTON et al., 2005). Deste modo, indivíduos AA possuem uma enzima mais eficiente do que indivíduos VV, enquanto os heterozigotos (AV) possuem uma eficiência intermediária em relação aos genótipos homozigotos (AMBROSONE et al., 1998).

Ao contrário do que se possa imaginar, a maior eficiência da enzima codificada pelo genótipo AA não significa um metabolismo antioxidante mais eficiente. Isto porque, a maior taxa de catálise do superóxido em peróxido de hidrogênio não é acompanhada por um aumento nos níveis de glutathione peroxidase, o que resulta no aumento dos níveis de H_2O_2 , os quais são mais permeáveis à membrana mitocondrial e levam à formação do radical hidroxila que é fortemente mutagênico e carcinogênico. Acredita-se que é por tal motivo que o genótipo AA esteja associado à maior prevalência de neoplasias como o câncer de mama, próstata, cólon (AMBROSONE et al., 1999; MITRUEN et al., 2001; EGAN et al., 2003; MILLIKAN et al., 2004, KOCABAS et al., 2005, BICA et al., 2008, BICA et al., 2009a). Além disso, TAUFER et al., (2005) também relatou associação do genótipo AA com maior imunosenescência celular, ou seja, indivíduos AA possuem um sistema inum mais deficiente que os demais genótipos, sendo assim mais suscetíveis a infecções, doenças auto-imunes e câncer. Apesar desta aparente

suscetibilidade ao câncer associada ao genótipo AA, AMBROSONE et al. (1999) já sugeriram que uma dieta rica em antioxidantes poderia reverter tal risco do genótipo.

Por outro lado, o genótipo VV sendo menos eficiente na catalise do O_2^- em H_2O_2 tende também a apresentar um quadro de estresse oxidativo associado que tem sido associado à disfunção endotelial (KAKKO et al., 2003), cardiomiopatia, níveis elevados de LDL-oxidado principalmente associados com diabetes mellitus do tipo II (GOTTLIEB et al., 2005), obesidade (MONTANO et al., 2009), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2009), metástase em linfonodos (BICA et al., 2010), entre outros.

Esta condição em que ambos homozigotos (AA e VV) apresentam maior suscetibilidade ao estresse oxidativo e a doenças sugere que este polimorfismo seria um modelo experimental importante para se analisar a dinâmica da resposta metabólica *in vitro* tanto a agentes pró-oxidantes quanto a agentes antioxidantes. Tais estudos poderiam servir como base para duas áreas que emergem na ciência: a nutrigenética e a farmacogenética. Ambas têm como meta a realização de estudos que levem à personalização tanto do consumo de determinados alimentos quando no uso de fármacos com vistas a uma melhor prevenção e terapêutica (KAPUT et al., 2005).

Entretanto, são necessários estudos complementares sobre os processos metabólicos diferenciais associados a estes genótipos quando expostos a agentes pró-oxidantes e/ou antioxidantes. Dentro deste contexto, o estudo aqui apresentado investigou a resposta metabólica *in vitro* de linfócitos provenientes de indivíduos com diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2 (AA, VV e AV) expostos a um agente pró-oxidante (radiação ultravioleta). É importante salientar que, a escolha da radiação ultravioleta como agente pró-oxidante para a realização deste estudo ocorreu por ser um fator físico diminuindo assim o nível de interferência nas condições da cultura de células como pH, solubilidade da molécula indutora do estresse oxidativo, etc.

4 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito apresentado a seguir. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados, Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito. A apresentação do manuscrito está baseada na versão submetida à revista *Redox Report* cujo título é “*Manganese Superoxide Dismutase V16A Gene Polymorphism in lymphocyte culture cells in response to ultraviolet radiation*”.

Manganese superoxide dismutase AlAla16Valal polymorphism in lymphocyte culture cells in response to ultraviolet radiation

Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner^a, Michele Sagrillo^b, Renata Chequeller Almeida^c, Michel Mansur Machado^d, Clarice Pinheiro Mostardeiro^e, Marta F. Frescura Duarte^f, Maria Fernanda Manica-Cattani^g, Thaís Doeler Algarve^h, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.ⁱ

^a Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, Santa Maria-RS, Brazil. ZP: 97105-900. email: greiceijui@yahoo.com.br

^b Centro Universitário Franciscano – UNIFRA, Rua Andradas, 1614, Santa Maria-RS. ZP: 97000.000. email: sagrillomr@yahoo.com.br

^c Laboratório de Biogenômica, Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria-RS, Brazil. ZP: 97105-900. email: re_cll@yahoo.com.br

^d Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, Santa Maria-RS, Brazil. ZP: 97105-900. email: michelmachado@globo.com

^e Departamento de Biologia e Química, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. Rua do Comércio, 3000, Bairro Universitário - Ijuí/RS - Brasil - ZP 98700-000. email: claricem@unijui.edu.br

^f Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, Santa Maria-RS, Brazil. ZP: 97105-900. email: duartmm@hotmail.com

^g Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, Santa Maria-RS, Brazil. ZP: 97105-900. email: marymanica@yahoo.com.br

^h Laboratório de Biogenômica, Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria-RS, Brazil. ZP: 97105-900. email: thais.algarve@gmail.com

ⁱ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, Santa Maria-RS, Brazil. ZP: 97105-900. email: ibmcruz@hotmail.com

Corresponding author: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Address: Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, Santa Maria-RS, Brazil. ZP: 97105-900. Phone: 55-55-32208736, Fax: 55-55-32208239
Email: ibmcruz@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to investigate whether there is a differential response of lymphocytes from healthy SOD2 genotype subjects to oxidative stress. We used UV radiation as a toxic agent due its genotoxic effects associated with chromosome aberrations caused by breaks in the DNA strands. Cellular rate growth, cell viability, mitotic index, chromosomal instability and biomarkers of oxidative metabolism were analyzed in lymphocyte cells from healthy adults with different Ala16Val SOD2 polymorphisms. We found a differential response of lymphocyte cell cultures from Ala16Val genotype donors to UV exposure. In general, AA cell cultures presented higher viability and mitotic index and lower TBARS levels than VV and AV cells in the control and UV exposure groups. However, when we compared the DNA damage among the three genotypes, AA lymphocyte cells presented higher damage to UV exposure. These data suggest that the Ala16Val polymorphism affects cell oxidative metabolism in different ways.

Key-words

ALA16VAL-SOD2 polymorphism, oxidative metabolism, DNA damage, ultraviolet radiation, lymphocyte culture.

INTRODUCTION

Endogenous antioxidant enzymes are vital to the regulation of oxidative stress within cells. Of these, one of the primary cellular antioxidants, superoxide dismutase (SOD), catalyzes the conversion of superoxide (O_2^-) to hydrogen peroxide (H_2O_2), which can then be removed by catalase (CAT), glutathione peroxidase or peroxiredoxins.¹

There are three distinct types of SOD activity found in human cells: two enzymes Cu/Zn-SOD and a mitochondrial matrix homotetrameric Mn-SOD.² Several lines of evidence suggest that Mn-SOD is crucial for life.³ The Mn-SOD is directly involved in mitochondrial superoxide catalysis⁴ and investigations have suggested that Mn-SOD acts as a tumor suppressor gene⁵ reporting that superoxide dismutase derivatives can significantly inhibit both the production of ROS and metastatic tumor growth.⁶ However, *in vitro* studies shown that a number of cancer cell lines contain elevated levels of SOD and decreased levels of CAT, and that this change in steady-state levels of H_2O_2 correlates with increased metastasis, proliferation and resistance apoptosis.^{7,8}

Epidemiologic evidence has also linked a single nucleotide polymorphism in Mn-SOD (SOD2 gene, rs4880) which increases its activity, to risk of developing several cancers. This polymorphism occurs due to the single nucleotide substitution at nucleotide 47, changing the encoded amino acid from Ala (GCT) to Val (GTT) known as the Ala16Val polymorphism in the mitochondrial targeting sequence (MTS).^{9,10} The Ala16Val polymorphism results in three genotypes: AA, VV and AV.

Investigations using *in vitro* Al Mn-SOD precursor generated 30-40% more of the active matrix, processed Mn-SOD homotetramer, than the Val MnSOD precursor. The Ala-MTS allowed efficient Mn-SOD import into the mitochondrial matrix, while the Val-variant caused partial arrest of the precursor within the inner membrane and decreased formation of the active Mn-SOD homotetramer in the mitochondrial matrix.¹¹

Several studies, including investigations performed by our team have suggested that Ala allele is associated with an increased risk of breast^{12,13,14,15} and prostate cancer.^{16,17,18} Moreover the Val allele has been associated with an increased risk of lung¹⁹ and bladder cancer²⁰ and also with cardiomyopathy²¹, higher LDL-oxidized levels²², obesity²³. A recent study performed by us in women breast cancer lymph node status showed that despite the AA genotype is well established to be associated with an increased risk of breast cancer, the VV genotype was associated with a higher metastatic potential.²⁴

The whole of these studies suggest a dual nature of antioxidant enzyme system in the progression of chronic degenerative diseases that need to be exploring with complementary investigations. In this context, the aim of this study was to investigate whether there is a differential response of lymphocytes from healthy Mn-SOD2 genotype subjects to oxidative stress. Cellular rate growth, cell viability, mitotic index, chromosomal instability and biomarkers of oxidative metabolism were analyzed in lymphocyte cells from healthy adults with different Ala16Val Mn-SOD gene polymorphism.

PATIENTS AND METHODS

Design

From a previous genetic population analyzed for several epidemiological aspects associated with Ala16Val gene polymorphism frequency^{12,15,16} we selected 12 healthy subjects with different genotypes (AA, VV and AV) without any diseases or morbidity conditions that could influence the lymphocyte in vitro analysis. The volunteers presented similar life style variables related to diet and physical activity to avoid possible environmental interferences. We asked subjects to not eat or drink antioxidant foods 24h before the blood collection. The Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Santa Maria approved the study protocol and informed consent was obtained from all individuals whose information was collected prospectively.

Blood sample collection

Peripheral blood samples were collected after 12 h overnight fasting by venipuncture, using top Vacutainer® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with heparin. An aliquot was used for the cell culture and other aliquots for the basal biochemical and DNA damage analysis. Blood specimens (5 ml) were routinely centrifuged within 1 h of collection for 15 min at 2500 g, and aliquots of plasma and erythrocyte samples were stored at -20°C until the biochemical analysis of the cell cultures. A blood sample (10 ml) was used for cytogenetic and biochemical analysis of the lymphocyte cultures.

Cell culture and UV radiation

Lymphocytes obtained through gradient centrifugation were immediately transferred to culture media containing 1 ml of RPMI 1640 (GIBCO) with 10% fetal

calf serum (FCS). Four culture glasses per subject were prepared and two glasses were exposed directly to UV radiation (300 nm) for 15 minutes (UV treatment) and two glasses were not exposed (control). We used UV exposition since this agent induces mainly pyrimidine dimers and relatively very few strand breaks, although some transient ones are generated during excision repair of the dimers. This time of UV exposition was chosen from a previous test that evaluated oxidative biochemical effects at 0, 20, 60 and 120 minutes of UV exposure in lymphocyte cell cultures. At 15 minutes of UV exposure we observed higher lipid peroxidation and decreased catalase and superoxide dismutase levels without cellular death. The cells were maintained in the suspension culture at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere in a RPMI 1640 growth medium (RPMI 0 medium) for 72 hours.

Mitotic Index and Chromosomal Instability

After 72h of culture, one aliquot of each treatment was used to investigate the mitotic index and chromosomal instability using G-band cytogenetic analysis.²⁵ At least 50 mitoses were analyzed in each sample.

Single cell gel electrophoresis (comet assay)

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al.²⁶ in accordance with general guidelines for use of the comet assay.^{27, 28, 29} One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected, and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration) according to tail length. Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal

migration). The slides were analyzed under blind conditions by at least two different individuals.

Cell viability

The cytotoxic effects of UV radiation on 72h lymphocyte cell cultures from different ALA16VAL MnSOD genotypes were determined by the loss of membrane integrity by the Trypan blue dye exclusion method.³⁰ At least 300 cells were counted for each survival determination. Cell viability was expressed as a percentage of the control value.

Biochemical analysis

Biochemical analysis associated with oxidative metabolism was performed using the blood samples collected from the subjects included in the study. We analyzed the biochemical basal values and 72h lymphocyte culture values. Total polyphenols were spectrophotometrically determined in plasma by reading absorbance at 750 nm (Folin-Ciocalteu method) and using gallic acid as a standard as described by Chandra et al.³¹ Thiol groups were determined as described by Ellman.³² Lipid peroxidation was quantified by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).³³ Total blood SOD (E.C.1.15.1.1) activity was measured spectrophotometrically according to Boveris et al.³⁴ The unit of activity is defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50%. Catalase activity (EC 1.11.1.6.) was determined according to Aebi.³⁵ One unit of catalase activity was defined as the activity required to degrade 1 μ mol of hydrogen peroxide in 60s. The total acid ascorbic concentration was measured according to an adapted method of Jacques-Silva et al.³⁶ Protein carbonyls

were measured according to the method previously described.³⁷ Results were expressed as nanomoles of carbonyl groups per mg of protein.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using version 12.0 of the SPSS software. Quantitative variables were compared using Student *t* test or one-way Anova followed by Tukey test.

RESULTS

Baseline characteristics of healthy volunteers with different Ala16Val gene polymorphism genotypes are presented in Table 1. Biomarkers of oxidative metabolism in blood samples of different genotypes differed in SOD and polyphenol levels after 12 h overnight fasting. The AA carriers presented higher SOD levels when compared to VV carriers. However, plasmatic total polyphenols were higher in VV than AA carriers. In both cases the heterozygous genotype (AV) presented intermediary SOD2 and total polyphenol levels.

Table 1 here

As expected, the mean number of metaphases was, in general, higher in the control (106.2 ± 43.1) than in UV-exposed (60.8 ± 38.2) lymphocyte cultures ($p=0.01$). Additionally, we found significant differences in the Ala16Val genotype mitotic index (Figure 1). In the control group, cell cultures from AA lymphocytes presented a higher metaphase count (203.8 ± 7.5) when compared to AV (91.0 ± 1.4) and VV (27.5 ± 2.9) lymphocyte cultures ($p=0.001$). The UV group showed a maintenance of these patterns among genotypes (AA>AV>VV metaphases counts). Independent of

genotype, there was a decrease in the mitotic index upon UV exposure. The metaphase count was significantly decreased in AA lymphocyte cultures, from 203.8 ± 7.5 in the control group to 101.3 ± 2.5 in the UV group ($p=0.001$); while in AV cultures it was decreased from 91.0 ± 1.4 to 69.40 ± 2.6 and in VV cultures it was decreased from 27.5 ± 2.9 to 9.5 ± 1.2 ($p=0.0001$). However, we did not observe chromosomal instability and apoptosis in lymphocyte cultures exposed to UV treatment and from healthy subjects with different Ala16Val genotypes.

Figure 1 here

The lymphocyte cell cultures did not present differences in viability between control and UV groups, among genotype groups or considering both variables together. However, when we performed an allele-dose effect analysis comparing the viability and mortality between AA subjects *versus* VV+AV subjects we observed that in control cultures AA lymphocytes presented higher viability than lymphocytes with at least one V allele. However, the higher AA viability was not maintained in the lymphocyte culture exposed to UV radiation. This difference in viability was not observed since there was higher viability in AV and VV cell cultures exposed to UV radiation when compared to the control group (Table 2).

Table 2 here

We observed significant differences in TBARS levels between AA and VV+AV cultures exposed to UV radiation (Figure 2). UV exposure of AA lymphocyte cells caused a decrease in TBARS levels when compared to the same cell in the control group. The TBARS concentration was 9.89 ± 5.23 in the AA control lymphocyte culture and 3.69 ± 0.89 in the UV exposed cell culture, expressed as nmol of MDA/ 10^6 cells ($p=0.05$). On the contrary, cells from VV and AV subjects presented a significant

increase in TBARS levels when exposed to UV radiation. The TBARS concentration was 5.44 ± 2.98 in the VV+AV control lymphocyte culture and 11.66 ± 6.43 in the UV exposed cell culture (nmol of MDA/ 10^6 cells at $p=0.039$). The other oxidative biomarkers investigated presented similar concentrations independent of UV exposure or Ala16Val genotype/allele.

Figure 2 here

DNA damage induced by UV exposure was evaluated using the comet assay under alkaline conditions. Table 3 shows the comet class and damage index and Figure 3 shows the mean values of the DNA tail moment in the lymphocyte cell cultures from different Ala16Val genotypes with or without UV exposure. The damage index was higher in the UV-exposed AA culture cells than in the control group of the same genotype ($p=0.05$). The VV and AV cell cultures presented a similar damage index between UV and control groups. In the case of AA lymphocyte cells, DNA damage was significantly increased as compared with the control group ($p=0.014$) and when compared to other lymphocyte cells from AV and VV genotypes ($p=0.042$).

Table 3 here

Figure 3 here

DISCUSSION

We report herein a differential response of lymphocyte cell cultures from Ala16Val genotypes donors to UV exposure. In general, AA cell cultures presented higher viability and mitotic index and lower TBARS levels than VV and AV cells in the control and UV exposure groups. However, when we compared DNA damage among the three genotypes, AA lymphocyte cells presented higher damage to UV exposure.

These data suggests that the Ala16Val polymorphism affects the cell oxidative metabolism in different ways.

In our experiment, the basal values showed similar levels to oxidative biomarkers with the exception of SOD levels which were higher in AA subjects and polyphenol total levels which were higher in VV subjects. However, after a 72h culture period these differences disappeared indicating that the oxidative biomarkers measured were similar in all samples that were cultivated under similar conditions.

We believe that the most important result from the present study is the differential oxidative response associated to the Ala16Val polymorphism despite the environmental similarities of the cell cultures. Apparently, the AA lymphocyte cell culture presented poor DNA damage and VV and AV lymphocyte cell cultures presented higher lipid peroxidation levels. As the AA suffered more DNA damage, these results corroborate with the previous suggestion that this genotype is more susceptible to oxidative agents than the others.

This delicate balance is achieved in part by antioxidant enzymes such as SOD, where SOD2 plays an important role in mitochondrial superoxide control. In a previous study performed by our group, we found an association between AA and DNA damage in peripheral blood cells of elderly as well as an association of this genotype with breast and prostate cancer and the immunosenescence profile.¹⁶

Additional investigations have shown an association between the AA genotype and male and female breast cancer.¹⁵ However, when the effect of the Ala16Val polymorphism on breast cancer regional lymph node status was evaluated in 281 controls and 93 cases of invasive breast cancer, we observed a higher VV genotype frequency in the positive lymph node group than in the control and negative lymph node group.²⁴ The results suggested that VV presented a higher metastatic potential

than the AA genotype. Bica et al.²⁴ suggested that there is a “paradox” in the MnSOD polymorphism, since mainly in cases of homozygosis (AA and VV) this variation causes an unbalance in anti-oxidant modulation increasing either superoxide levels in VV subjects or hydrogen peroxide levels in AA subjects. In both cases, environmental interactions could increase or decrease the risk of non-transmissible morbidities such as neoplasias and cardiovascular diseases. The results described here corroborate with this suggestion since we observed two oxidative stress situations that could explain the greater susceptibility to cancer of the AA genotype and the metabolic susceptibility of the V allele.²⁴

It is important to mention the oxidative effect of UV exposure shown by the higher lipid peroxidation levels observed in the VV and AV genotypes. Investigations have shown that UV radiation increased ROS, activating signaling pathways involved in regulating cell growth, differentiation and proliferation.² UV exposure may affect diverse biological functions including DNA replication, repair, cell cycle control and chromatin remodeling. All these facts may contribute to the increased risk of cancer, mainly skin cancer.³⁸ UV exposure induces H₂O₂ production³⁸ inducing lipid and protein oxidation at the plasma membrane, which may cause a loss of membrane fluidity, inactivation of enzymes, and alteration of ion permeability. These changes may cause rupture of the cells by an osmotic process.³⁹ Therefore, V allele carriers cannot be considered to provide antioxidant protection when compared to AA genotype carriers.

In summary, although our study involved a relatively small number of subjects, our results suggest that Ala16Val genotypes may present differential oxidative stress responses to chronic diseases such as cancer. However, complementary

investigations to observe the response of Ala16Val genotypes to oxidative stress agents in the presence of potential antioxidant compounds.

Acknowledgements

This research work was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) of Brazil and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors would like to express their gratitude to team of Laboratório de Biogenômica.

REFERENCES

1. Emerit I. 'Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis'. *Free Radic Biol Med* 1994, 16:99–109.
2. Martin RCG, Li Y., Liu Q., Jensen NS, Barker DF, Doll MA, Hein DW. 'Manganese superoxide dismutase V16A single-nucleotide polymorphism in the mitochondrial targeting sequence is associated with reduced enzymatic activity in cryopreserved human hepatocytes'. *DNA Cell Biol* 2009, 28:3-7.
3. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. 'Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase'. *Nature Genet* 1995, 11:376-381.
4. Emerit I. 'Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis'. *Free Radic Biol Med* 1994, 16:99–109.

5. Oberley LW, Oberley TD. 'The role of superoxide dismutase and gene amplification in carcinogenesis'. *J Theor Biol* 1984, 106:403-422.
6. Hyoudou K, Nishikawa M, Kobayashi Y, Ikemura M, Yamashita F, Hashida M. 'SOD derivatives prevent metastatic tumor growth aggravated by tumor removal'. *Clin Exp Metastasis* 2008, 25:531-536.
7. Chung-man HJ, Zheng S, Comhair SA, Farver C, Erzurum SC. 'Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer'. *Cancer Res* 2001, 61:8578-8585.
8. Skrzydlewska E, Kozusko B, Sulkowska M, Bogdan Z, Kozlowski M, Snarska J, Puchalski Z, Sulkowski S, Skrzydlewski Z. 'Antioxidant potential in esophageal, stomach and colorectal cancers'. *Hepatogastroenterology* 2003, 50:126-131.
9. Shimoda-Matsubayashi S, Matumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. 'Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene'. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 226:561-565.
10. Millikan RC, Player J, Cotret AR, Moorman P, Pittman G, Vannappagari V, Tse CJ, Keku T. 'Manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism and risk of breast cancer in a population-based case-control study of African American and whites'. *Breast Cancer Res* 2004, 6:R264-R274.
11. Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. 'The A1Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria'. *Pharmacogenet* 2003, 13:145-157.
12. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA, Bowman E, Vena JE, Marshall JR, Graham S, Laughlin R, Nemoto T, Shields P. 'Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphism, dietary antioxidants, and risk of breast cancer'. *Cancer Res* 1999, 59:602-606.

13. Egan K, Thompson P, Titus-Ernstoff L, Moore J, Ambrosone C. 'MnSOD polymorphism and breast cancer in a population-based case-control study'. *Cancer Lett* 2003, 199:27-33.
14. Eras-Erdogan N, Akbas E, Senli H, Kul S, Çolak T. 'Relationship between polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and breast cancer'. *Mutat Res* 2009, 680: 7-11.
15. Bica CG, da Silva LLM, Toscani NV, da Cruz IBM, Sá G, Graudenz MS, Zettler CG. 'MnSOD Gene Polymorphism Association with Steroid-Dependent Cancer'. *Pathol Oncol Res* 2009, 15:19-24.
16. Taufer M, Peres A, de Andrade VM, De Oliveira G, Sá G, do Canto MEP, dos Santos AR, Bauer ME, da Cruz IBM. 'Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process?' *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005, 60:432-8.
17. Woodson K, Tangrea J, Lehman T, Madali R, Taylor K, Snyder K, Taylor P, Vitamo J, Albanes D. 'Manganese superoxide dismutase (MnSOD) polymorphism, alpha-tocopherol supplementation and prostate cancer risk in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study (Finland)'. *Cancer Causes Control* 2003, 14:513-518.
18. Bica CG, da Silva LLM, Toscani NV, da Cruz IBM, Sá G, Graudenz MS, Zettler CG. 'MnSOD gene polymorphism association with steroid-dependent cancer'. *Pathol Oncol Res* 2009, 15:19-24.
19. Wang L, Miller D, Sai Y, Liu G, Wain J, Lunch T, Christiani D. 'Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk'. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93:4471-4473.
20. Hung R, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Gelatti U, Placidi E, Carta A, Hautefeuille A, Porru S. 'Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions and bladder cancer risk'. *Carcinogenesis* 2004, 25:973-978.

21. Hiroi S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A. 'Polymorphism in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese'. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 261:332-339.
22. Gottlieb MG, Shwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Müssel DP, da Cruz IBM. 'Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population'. *Genet Mol Res* 2005, 4:691-703.
23. Montano MA, Lera JP, Gottlieb MG, Schwanke CH, da Rocha MI, Manica-Cattani MF, dos Santos GF, da Cruz IBM. 'Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity'. *Mol Cell Biochem* 2009, 328:33-40.
24. Bica CG, Silva LL, Toscani NV, Zettler CG, Gottlieb MG, Alexandre CP, Graudenz MS, Cruz IBM. Ala-16-Val manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism correlates to breast cancer regional lymph node status. *Cancer Gen Cytogen* (in press).
25. Yunis JJ. 'High resolution of human chromosomes'. *Science* 1976:1268-1270.
26. Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. 'A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells'. *Exp Cell Res* 1988, 175:184-191.
27. Tice RR, Agurell D, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 'Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing'. *Environ Mol Mutagen* 2000, 35:206-221.
28. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith G, Speit G, Thybaud V, Tice RR. 'Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay'. *Mutagenesis* 2003, 18:45-51.

29. Nadin S, Vargas-Roig L, Ciocca D. 'A silver staining method for single-cell gel assay'. *J Histochem Cytochem* 2001, 49:1183-1186.
30. Burow ME, Weldon CB, Tang Y, Navar GL, Krajewski S, Reed JC, Hammond TG, Clejan S, Backman BS. 'Differences in susceptibility to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants'. *Cancer Res* 1998, 58:4940-4946.
31. Chandra S, de Mejia EG. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinine reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas'. *J Agric Food Chem* 2004, 52:3583-3589.
32. Ellman GL. 'Tissue sulphydryl groups'. *Arch Biochem Biophys* 1959, 589:70-77.
33. Ohkawa H, Ohishi H, Yagi K. 'Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction'. *Anal Biochem* 1979, 95:351-358.
34. Boveris A, Cadenas E. Cellular source and steady-state levels of reactive oxygen species. In: Clerch L, Massaro D. *Oxygen, gene expression and cellular function*. Marcel Decker 1997, 105:1-25.
35. Aebi H. 'Catalase in vitro'. *Methods Enzymol* 1984, 105:121-127.
36. Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EMM, da Rocha JBT. 'Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice'. *Pharmacol Toxicol* 2001, 88:119-125.
37. Morabito F, Cristiani M, Saija A, Stelitano C, Callea V, Tomaino A, Minciullo PL, Gangemi S. 'Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma'. *Mediators Inflamm* 2004, 13:381-383.

38. Syed DN, Malik A, Hadi N, Sarfara S, Afaq F, Mukhtar H. 'Photochemopreventive effect of pomegranate fruit extract on UVA-mediated activation of cellular pathways in normal human epidermal keratinocytes'. *Photochem Photobiol* 2006, 82:398-405.
39. Bommareddy A, Hora J, Cornish B, Dwivedi C. 'Chemoprevention by alpha-santalol on UVB radiation-induced skin tumor development in mice'. *Anticancer Res* 2007, 27:2185-2188.

Table 1 Characteristics baselines and biomarkers of oxidative metabolism in blood samples after 12 h overnight fasting of healthy volunteers with different SOD2 genotypes.

Variables	AA (mean±SD)	VV (mean±SD)	AV (mean±SD)	p
Age (Mean ±SD)	22.65±3.67 ^a	22.04±3.08 ^a	22.78±3.99 ^a	0.673
BMI (Kg/m ²)	21.76±2.35	22.08±2.39	22.87±2.44	0.546
TBARS (nmol/mL erythrocytes)	8.05±3.46 ^a	18.83±12.16 ^b	30.19±0.26 ^{ab}	0.036
Thiol Groups (mmol/mL erythrocytes)	226.82±70.42 ^a	212.93±80.19 ^a	268.87±91.68 ^a	0.710
SOD (uSOD)	53.22±4.57 ^a	40.49±10.41 ^b	56.73±5.60 ^{ab}	0.036
Polyphenols (mg/mL plasma)	4.44±0.33 ^a	5.87±0.75 ^b	4.70±0.83 ^{ab}	0.049
Catalase (µmol of H ₂ O ₂ /mL eritrocytes/min)	31.28±8.74 ^a	29.02±3.67 ^a	33.26±7.86 ^a	0.753
Protein carbonyl (nmol/mg protein)	0.09±0.11 ^a	0.08±0.02 ^a	0.07±0.01 ^a	0.135
Acid ascorbic (nmol/mL plasma)	18.24±9.96 ^a	19.80±11.78 ^a	20.82±5.51 ^a	0.923

SD= standard deviation;

Table 2 Viability lymphocyte cell culture (%) considering UV radiation and A16V-SOD2 genotypes.

Genotypes	Control		UV radiation	
	Mean±SD	<i>p</i>	Mean±SD	<i>p</i>
AA	88.70±3.03 ^a	0.031	86,79±4.84	0.353
AV	78,73±7.83 ^b		86,13±3.64	
VV	79,09±8.01 ^b		88.42±3.35	
Total	82,45±7.65		86.85±3.77	

SD= standard deviation. Bars with different letters represent means significantly different ($p < 0.05$) using analysis of variance (ANOVA) followed by *post hoc* Tukey test.

Table 3 DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of UV exposition in lymphocyte culture cell from donors with different A16V-SOD2 genotypes

Genotypes	Subjects	Comet Class					Index damage
		0	1	2	3	4	
AA							
1	Control	62	28	4	4	2	0,38
	UV	50	26	8	4	12	0,50
2	Control	52	28	10	4	6	0,48
	UV	48	28	6	12	6	0,52
3	Control	84	10	2	0	4	0,16
	UV	58	26	6	6	4	0,42
4	Control	58	24	2	8	8	0,42
	UV	54	28	6	6	6	0,46
Mean+SD	Control	62±9	25±6	4±2	5±3	4±2	0.37±0.07
	UV	53±4	28±2	7±1	4±2	8±3	0.47±0.04
VV							
1	Control	56	30	4	2	8	0,44
	UV	58	26	10	2	4	0,42
2	Control	74	14	4	2	6	0,26
	UV	62	26	6	0	6	0,38
3	Control	56	22	10	4	8	0,44
	UV	50	30	6	4	10	0,50
Mean+SD	Control	62±9	22±8	6±3	3±1	7±1	0.38±0.10
	UV	56±6	27±2	7±2	2±1	7±3	0.43±0.06
AV							
1	Control	66	20	8	2	4	0,34
	UV	80	14	2	0	4	0,20
2	Control	60	18	2	14	6	0,40
	UV	62	16	0	8	14	0,38
3	Control	82	10	4	2	2	0,18
	UV	54	36	2	6	2	0,46
4	Control	76	20	4	0	0	0,24
	UV	70	30	0	0	0	0,30
Mean+SD	Control	66±7	20±2	4±2	6±3	4±2	0.34±0.07
	Mean	67±9	23±9	2±1	5±3	5±3	0.33±0.11

SD= standard deviation; Index damage: $\Sigma (1,2,3,4 \text{ comet class})/100$.

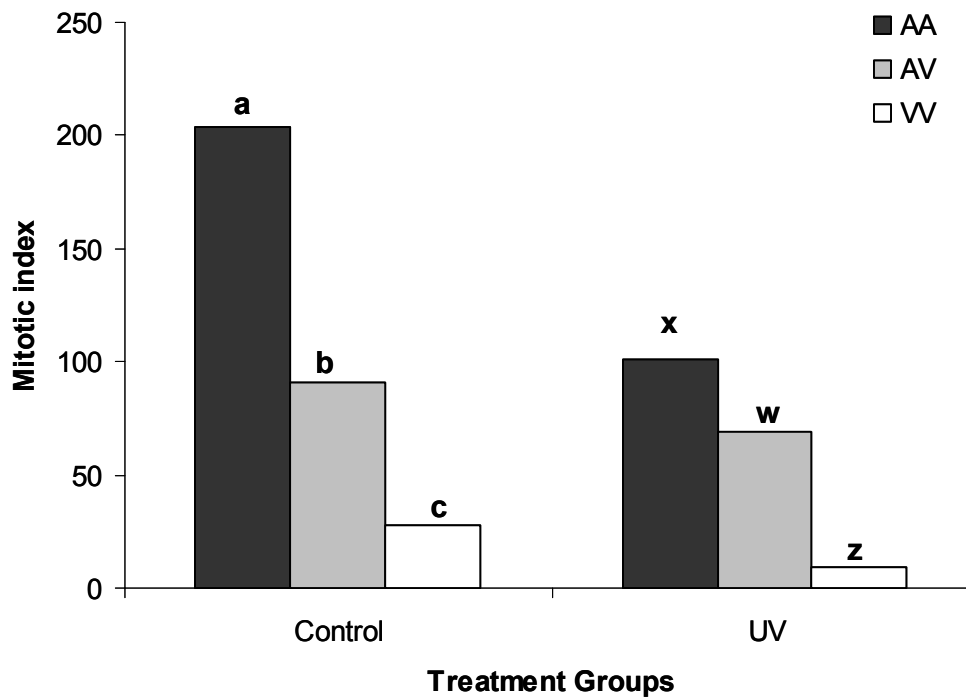


Figure 1 Mitotic index comparison among A16V SOD2 gene polymorphism genotypes (AA, AV and VV) in lymphocytes cell cultures in without (control) and with ultraviolet radiation (UV) exposition. Different letters in each treatment represent significant differences among genotypes using analysis of variance followed by Tukey test, $p < 0.01$ (a,b,c to control group and x,w,z to UV exposition group).

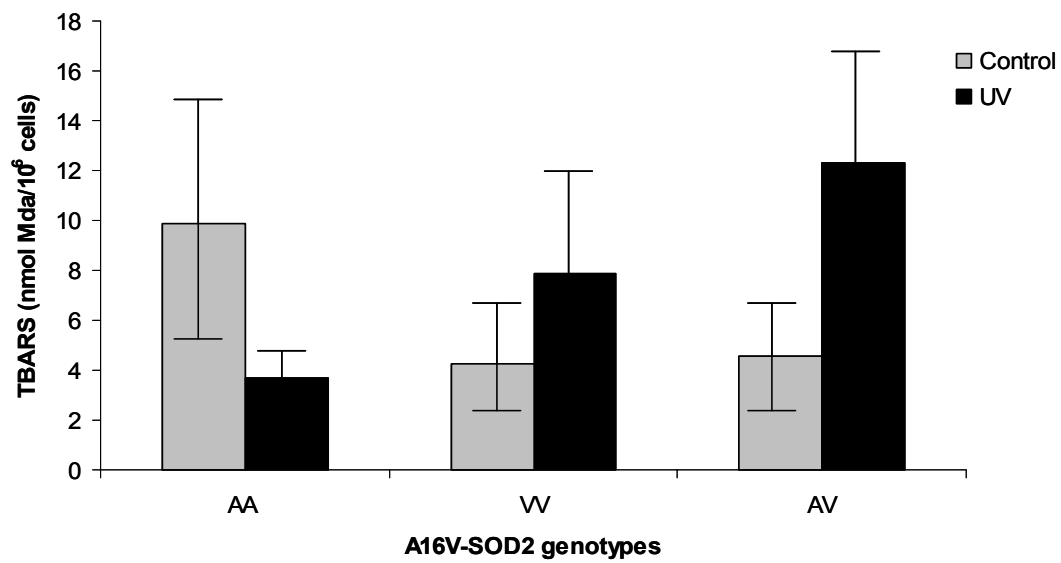


Figure 2 Lipid peroxidation (TBARS) comparison between each lymphocyte cell culture from subjects to different A16V-SOD2 genotypes with and without UV exposition

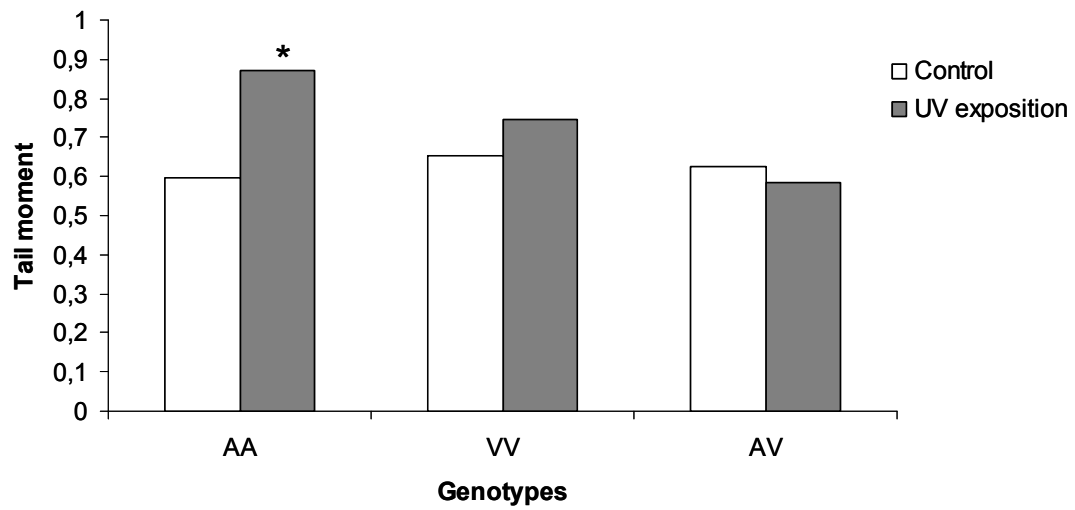


Figure 3 DNA damage to UV exposition in lymphocyte cell culture from subjects with different A16V-SOD2 genotypes. DNA damage was measured by comet assay. The values represent the mean of four culture cells to AA, VV and AV genotypes \pm SE with and without UV exposition. An asterisk (*) denotes $p < 0.01$ in a Dunnett's test after one-way ANOVA of Tail Moment of A16V-SOD2 genotypes vs. UV exposition.

5 DISCUSSÃO

O conjunto dos resultados obtidos mostrou resposta diferencial associada ao polimorfismo Ala16Val-SOD2 nos indicadores avaliados (celulares, bioquímicos e genotóxicos) em cultura celular de linfócitos expostos à radiação UV. O status redox pode determinar quando as células estão em repouso, proliferam ou morrem. As células saudáveis têm um balanço redox satisfatório. O desbalanço entre oxidantes e antioxidantes nas células freqüentemente resulta no surgimento de processos patológicos ou de doenças. Este delicado desbalanço pode ocorrer, em parte, por enzimas antioxidantes como a SOD2, uma vez que a SOD2 é a enzima mais importante no controle dos níveis de superóxido mitocondrial. Deste modo, alterações na sua eficiência geneticamente causadas podem ter, ao longo da vida do indivíduo efeitos importantes no desenvolvimento de doenças associadas ao estresse oxidativo tanto no que diz respeito à presença de maiores níveis de superóxido (o que potencialmente ocorre em indivíduos VV) quanto na presença de maiores níveis de peróxido de hidrogênio (o que potencialmente ocorre em indivíduos AA).

Apesar dos estudos epidemiológicos indicarem associação de doenças crônicas degenerativas com os dois genótipos homocigotos (VV e AA) a compreensão deste processo ainda não está totalmente esclarecida. Isto porque, estudos *in vivo* implicam na influência de uma quantidade muito grande de variáveis que podem mascarar os resultados e dificultar a sua interpretação. Neste contexto, é que investigações *in vitro* de células provenientes de indivíduos com diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val MTS-SOD2 são relevantes.

Assim, na análise feita no presente estudo de indicadores celulares e bioquímicos oxidativos sugeriu que linfócitos AA teriam maior taxa de viabilidade e proliferação celular e menores níveis de peroxidação lipídica do que linfócitos AV e VV independente da exposição à radiação UV. Por outro lado, linfócitos AA expostos a radiação UV apresentaram maior nível de genotoxicidade (dano de DNA) quando comparados com os demais genótipos.

Tais resultados são instigantes e, apesar de preliminares corroboram com resultados epidemiológicos publicados na literatura de que o genótipo AA estaria

associado a neoplasias como o câncer de mama, próstata e cólon. (AMBROSONE et al., 1999; MITRUEN et al., 2001; EGAN et al., 2003; MILLIKAN et al., 2004; KOCABAS et al., 2005; BICA et al., 2008; BICA et al., 2009a,b) Isto porque, é geralmente aceito que altos níveis de EROs precedem desbalanços no metabolismo celular que estão envolvidos nos processos de carcinogênese (MENA et al., 2009).

O estresse oxidativo continuado predispõe a mutações no DNA, que não sendo reparadas podem desencadear os eventos iniciais que levam a formação das células cancerosas. A principal EROs indutora de mutações no DNA é o radical hidroxil que geralmente é formado a partir do excesso de moléculas de peróxido de hidrogênio disponíveis no citoplasma. O peróxido de hidrogênio em excesso tende a reagir com íons metais (Reação de Fenton), principalmente ferro e cobre produzindo o radical hidroxil que tem alta afinidade pelo DNA (BERRA et al., 2006).

A ligação do hidroxil ao DNA pode causar mutações que, por sua vez, podem desencadear a proliferação descontrolada da célula e a indução de novas mutações e alterações homeostáticas que a tornam uma linhagem maligna. Portadores do genótipo AA possuem uma maior eficiência na catálise do superóxido em peróxido de hidrogênio, no entanto esta condição não desencadeia uma retroalimentação positiva das enzimas que catalisam o peróxido de hidrogênio em água. Deste modo, na ausência de fatores antioxidantes exógenos portadores do genótipo AA teriam maior probabilidade de gerarem moléculas de hidroxil e, portanto lesar o DNA.

Esta premissa subsidiou o primeiro estudo epidemiológico realizado por AMBROSONE et al. (1999) sobre a possível associação entre o polimorfismo Ala16Val-SOD2 e maior suscetibilidade ao câncer de mama. A investigação mostrou que, o genótipo AA aumentava cerca de quatro vezes o risco de mulheres desenvolverem câncer de mama em relação aos demais genótipos.

Investigações complementares em outras populações também encontraram resultados similares, incluindo estudos conduzidos pelo grupo de pesquisa que participa do estudo aqui descrito, encontraram associação positiva entre o genótipo AA com câncer de mama em mulheres e em homens e com câncer de próstata (BICA et al., 2009a,b) e também com indicadores de imunosenescência (TAUFER et al., 2005).

Como foi aqui encontrada maior indicação de genotoxicidade em linfócitos AA expostos a radiação UV tal resultado reforça a hipótese da associação entre este genótipo com o câncer de mama e próstata. Entretanto, um questionamento que

permanece em aberto é o quanto a presença adicional de um fator antioxidante poderia reverter *in vitro* esta suscetibilidade. Esta questão será ser tema de investigação futura.

Outro aspecto que necessita ser discutido diz respeito ao desbalanço causado por níveis aumentados de superóxido que tendem a ocorrer em indivíduos com genótipos VV causados pela menor eficiência da enzima. Assim como o genótipo AA, o genótipo VV também sido associado com diversas morbidades incluindo cardiopatia não familiar de origem idiopática (HIROI et al., 1999), neuropatias na diabetes mellitus tipo-1 (MÖLLSTEN, et al., 2007), disfunção endotelial (KAKKO et al., 2003). Outro estudo recentemente publicado pelo nosso grupo de pesquisa indicou que apesar do genótipo AA aumentar o risco de câncer de mama, mulheres com câncer de mama portadoras do genótipo VV tendem a possuir um tumor mais agressivo, ou seja, com maior potencial de geração de metástases (BICA et al., 2010), associação níveis aumentados de LDL-oxidado (GOTTLIEB et al., 2005) e com obesidade (MONTANO et al., 2009).

Uma das possíveis explicações que podem ser postuladas sobre a associação do genótipo VV com estes distúrbios estaria relacionada ao controle das taxas de peroxidação lipídica. É bem conhecido que a peroxidação lipídica é induzida por radicais superóxido gerados pela redução de um elétron na molécula de oxigênio. (ANDRADE-JÚNIOR et al., 2005). Portanto, níveis aumentados de superóxido possivelmente poderiam aumentar este tipo de dano celular. Os resultados aqui obtidos corroboram esta hipótese uma vez que linfócitos provenientes de indivíduos com pelo menos um alelo V apresentaram maior taxa de peroxidação lipídica do que em linfócitos de indivíduos AA, independente de serem ou não expostos a radiação UV.

A relevância dos resultados obtidos tem sido corroborada por investigações experimentais envolvendo o polimorfismo Ala16Val-SOD2 como o recente trabalho realizado em duas populações de pacientes dos Estados Unidos e Norway, que receberam terapia adjuvante com ciclofosfamida (GLYNN et al., 2009). Neste estudo, os pacientes com câncer de mama receberam terapia adjuvante de ciclofosfamida, observou-se que os portadores do alelo A possuíam menores índices de sobrevivência ao tratamento do que os portadores do alelo V.

Finalmente é importante tecer comentários sobre aspectos relacionados à metodologia e suas limitações potenciais. O presente estudo utilizou como agente

pró-oxidante a radiação UV. Isto porque, investigações têm demonstrado que a radiação UV aumenta as EROs, ativando as vias de sinalização envolvidas na regulação do crescimento celular, diferenciação e proliferação (MARTIN et al., 2009). A exposição à radiação UV pode afetar diversas funções biológicas incluindo a replicação do DNA, reparo, controle do ciclo celular e remodelamento da cromatina. Todos esses fatos podem contribuir para o aumento do risco de câncer, principalmente o câncer de pele (MENA et al., 2009). A exposição à UV induz a produção de H_2O_2 (SYED et al., 2006) incluindo a oxidação de lipídios e proteínas na membrana plasmática, as quais podem causar a perda da fluidez, inativação de enzimas e alteração na permeabilidade de íons. Estas mudanças podem causar ruptura nas células através do processo osmótico (BOMMAREDDY et al., 2007). Entretanto, por se tratar de um estudo exploratório inicial optou-se pela escolha de uma única dose de radiação UV a fim de concentrar as análises nas respostas diferenciais associadas aos genótipos. Também se optou por uma dose que não causasse alterações dramáticas celulares, mas sim que fosse suficiente para gerar algum nível biológico de resposta celular. Deste modo, estudo complementar para averiguar se os efeitos relacionados à exposição à radiação UV seriam dose dependentes precisa ser conduzido.

Outro aspecto relevante diz respeito ao tamanho da amostra utilizada no presente estudo. Uma vez que variações micro-ambientais podem influenciar a resposta celular o estudo foi delineado para realizar todas as etapas experimentais de modo concomitante diminuindo tal influência. Por este motivo, o poder estatístico do tamanho amostral de quatro indivíduos por genótipo e sua distribuição em culturas expostas e não expostas a radiação UV pode ser considerado suficiente já que todos desde o procedimento da coleta até as análises dos indicadores celulares, bioquímicos e genotóxicos foram processados no mesmo momento e pela mesma equipe de pesquisadores.

Infelizmente, o número de trabalhos associando variações genéticas e estudos *in vitro* ainda é pequeno, porém acredita-se que a integração destas duas abordagens seja valiosa e de grande poder informativo em estudos sobre a influencia do metabolismo oxidativo em doenças de alta complexidade como é o caso do câncer ou mesmo da aterosclerose.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, apesar do estudo aqui descrito ser exploratório e inicial os resultados sugerem que os genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2 podem apresentar resposta diferencial ao estresse oxidativo independente de outros fatores antioxidantes exógenos. Entretanto, serão necessárias investigações complementares para averiguar a resposta dos genótipos Ala16Val-SOD2 a outros agentes pró-oxidantes, a resposta na presença de compostos antioxidantes e ainda na presença de ambos a fim de contribuir na busca de novos alimentos funcionais que tenham impacto positivo na saúde humana.

Também é importante a realização de estudos utilizando linhagens de células neoplásicas oriundas de indivíduos portadores de diferentes genótipos deste polimorfismo a fim de contribuir para a elucidação do mecanismo de ação da SOD2 no processo de carcinogênese. Além disso, faz-se importante outras abordagens metodológicas como análise da expressão gênica.

7 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- averiguar se os efeitos relacionados à exposição à radiação UV seriam dose dependentes;
- observar se há resposta diferencial dos genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2 a outros agentes pró-oxidantes;
- observar a resposta do polimorfismo Ala16Val a agentes antioxidantes;
- verificar a influência do polimorfismo Ala16Val no metabolismo oxidativo de células neoplásicas;
- incluir nas abordagens metodológicas análises de expressão gênica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-JÚNIOR, D. R. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.31, p.60-68, 2005.

AMBROSONE, C. B. et al. Breast câncer risk, meat consumption and N-acetyltransferase (NAT2) genetic polymorphism. **International Journal of Cancer**, v.16, p.825-830, 1998.

AMBROSONE, C. B. et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphism, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. **Cancer Research**, v.59, p. 602-606, 1999.

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, p.113-23, 2006.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA repair**, v.3, p.1109-1115, 2004.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v.29, 1340-1344, 2006.

BICA, C. G. et al. MnSOD gene polymorphism association with steroid-dependent cancer. **Pathology Oncology Research**, v.13, p.1-6, 2008.

BICA, C.G. et al. Ala-16-Val Manganese-Dependent Superoxide Dismutase (MnSOD) Gene Polymorphism Correlates To Breast Cancer Regional Lymph Node Status. **Cytogenetics and Cell Genetetics** v193, p1-12, 2009a.

BICA, C. G. et al. MnSOD Gene Polymorphism Association with Steroid-Dependent Cancer. **Pathology and Oncology Research**, v. 15, p.19-24, 2009b.

BICA, C. G. et al. Ala-16-Val manganese-dependent superoxide dismutase (Mnsod) gene polymorphism correlates to breast cancer regional lymph node status. **Cancer Gen Cytogen** (in press).

BOMMAREDDY, A. et al. Chemoprevention by alpha-santalol on UVB radiation-induced skin tumor development in mice. **Anticancer Research**, v.27., p.2185-2188, 2007.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radicals in Biological and Medicine**, v.22, p.749-760, 1997.

CATAPANO, A. L. Antioxidant effect of flavonoids. **Angiology**, v.48, p.39-44, 1997.

CATALGOL, B. K.; OZDEN, S.; ALPERTUNGA, B. Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v.21, p.1538-1544, 2007.

CEMELI, E.; BAUMGARTNER, A; ANDERSON, D. Antioxidants and the comet assay. **Mutation research/reviews in mutation research**, v.681, p.51-67, 2009.

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

CHANCE, B.; SARONIO,C.; LEIGH, J. S. Compound C@, a product of the reaction of oxygen and the mixed-valences state of cytochrome oxidase. Optical evidence for a type-I copper. **Biochemical Journal**, v.177, p.931-940, 1979.

CHURCH, S. L. et al. Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. **Genomics**, v.14, p.823-825, 1992.

CREAGAN, R. et al. Chromosome assignments of genes in man using mouse-human somatic cell hybrids: mitochondrial superoxide dismutase (indophenol oxidase-B, tetrameric) to chromosome 6. **Humangenetik**, v.20, p.203-209, 1973.

ÇIMEN, M.Y.B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v.390, p.1-11, 2008.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v.329, p.23-28, 2003.

DUARTE, M. M. F. et al. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p.666-671, 2009.

EGAN, K. M. et al. MnSOD polymorphism and breast cancer in a population-based case-control study. **Cancer Letters**, v.199, p.27-33, 2003.

ELLIS, E. M. Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutical intervention, **Pharmacology and therapeutics**, v.115, p.13-24, 2007.

EMERIT, I. Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v16, p.99-109, 1994.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas e sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.

FOSTER, L. H.; SUMAR, S. Selenium in health and disease: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.37, p.211-228, 1997.

GLYNN, S. A. et al. A Mitochondrial Target Sequence Polymorphism in Manganese Superoxide Dismutase Predicts Inferior Survival in Breast Cancer Patients Treated with Cyclophosphamide. **Clinical Cancer Research**, v.15, p.4165-3173, 2009.

GOETZ, M. E., LUCH, A. Reactives species: a cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. **Cancer Letters**, v.266, p.73-83, 2008.

GOTTLIEB, M. G. V. et al. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. **Genetics and Molecular Research**, v.4, p.691-703, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford express, 1999.

HIROI, S. et al. Polymorphisms in the *SOD2* and *HLA-DRB1* genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.261, p.332-339, 1999.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, p.1170-1179, 2008.

IP, C. et al. Chemical form of selenium, critical metabolites and **cancer** prevention. **Cancer Research**, v.51, 595-600, 1991.

ISIDÓRIO, M. S.; SILVEIRA, L. R. Modulação do balanço redox em crianças atletas: possíveis efeitos do exercício e da suplementação antioxidante. **Revista Brasileira de Nutrição**, v.22, p.127-134, 2008.

JIA, Z.; MISRA, H. P. Reactive oxygen species in in vitro pesticide-induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: role of NFκB and caspase-3. **Free Radical Biology and Medicine**, v.42, 288-298, 2007.

KAPUT, J. et al. Horizons in nutritional science. **British Journal of Science**, v.94, p.623-632, 2005.

KAKKO, S. et al. The signal polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.168, p.147-152, 2003.

KOCABAS, N. A. et al. Genetic polymorphism of manganese superoxide dismutase (MnSOD) and breast cancer susceptibility. **Cell Biochemistry and Function**, v.23, p.73-76, 2005.

KOCH, O. R. et al. Ethanol treatment up-regulates the expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase in rat liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.201, p.1356-1365, 1994.

LI, Y. et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nature Genetics**, v.11, p.376-381, 1995.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta**, v.380, p.50-58, 2007.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.727-747, 2004.

MARKLUND, S. L. Human copper-containing superoxidedismutase of high molecular-weight. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.79, p.7634-7638, 1982.

MARNETT, L. J. Oxyradicals an DNA damage. **Carcinogenesis**, v.21, p.361-370, 2000.

MARTIN, R. C. G. et al. Manganese superoxide dismutase V16A single-nucleotide polymorphism in the mitochondrial targeting sequence is associated with reduced enzymatic activity in cryopreserved human hepatocytes. **DNA Cell Biology**, v.28, p.3-7, 2009.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.6049-6055, 1969.

MENA, S.; ORTEGA; A. ESTRELA, J. M. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.647, p.36-44, 2009.

MICALLEF, M.; LEXIS, L.; LEWADOWSKI, P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. **Nutrition Journal**, v.6, p.1-8, 2007.

MILLIKAN, R. C. et al. Manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism and risk of breast cancer in a population-base case-control study of African Americans and whites. **Breast Cancer Research**, v.6, p.264-274, 2004.

MITRUEN, K. et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. **Carcinogenesis**, v.22, p.827-829, 2001.

MÖLLSTEN, A. et al. A functional polymorphism in the Manganese Superoxide Dismutase gene and diabetic nephropathy. **Diabetes**, v.56, p.265-169, 2007.

MONTANO, M. A. E. et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.328, p.33-40, 2009.

NOMURA, K. et al. Involvement of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as an antiapoptotic factor. **Biological Signals and Receptors**, v.10, p.81-92, 2001.

OBERLEY, L. W. **Superoxide Dismutase**. Boca Raton: CRC Press, 1982, v.2.

PERERA, C. S.; ST. CLAIR, D. K.; McCLAIN, C. J. Differential regulation of manganese superoxide dismutase activity by alcohol and TNF in human hepatoma cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.323, p.471-476, 1995.

RAYMAN, M. P. The importance of Selenium in human health. **Lancet**, v.356, p.233, 2000.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Sciences**, v.2, p.2152-2159, 1997.

RICHTER, C. Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. **Mutation Research**, v.275, p.249-255, 1992.

ROVER JÚNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.1, p.112-119, 2001.

SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A . P. Reparação de DNA em células eucarióticas. In: **Genética Toxicológica**, SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P., Editora ALCANCE, p.271-308, 2003.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.995-1014, 2005.

SGARBI, F. C.; CARMO, E. D.; ROSA, L. E. B. Radiação ultravioleta e carcinogênese. **Revista de Ciências Médicas**, v.16, p.245-250, 2007.

SUTTON, A. et al. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. **Pharmacogenetics**, v.13, p.145-157, 2003.

SUTTON, A. et al. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. **Pharmacogenetics and Genomics**, v.15, p.311-319, 2005.

SYED, D. N. et al. Photochemopreventive effect of pomegranate fruit extract on UVA-mediated activation of cellular pathways in normal human epidermal keratinocytes. **Photochemistry and Photobiology**, v.82, p.398-405, 2006.

TAUFER, M. et al. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? **Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v.60, p.423-438, 2005.

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

VASCONCELOS, S.M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, p.1323-1338, 2007.

WALLACE, D.C. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science**, V.283, P.1482-1488, 1999.

WALLE, T. et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals**, v.32, p.1377-1382, 2004.

WEISIGER, R. A.; FRIDOVIC, I. Mitochondrial superoxide dismutase-site of synthesis and intramitochondrial localization. **The Journal of Biological Chemistry**, v.248, p.4793-4796, 1973.

WISCHERMANN, K. et al. Uva radiation causes DNA strand breaks, chromosomal aberrations and tumorigenic transformation in HaCat skin keratinocytes. **Oncogene**, v. 27, p.4269-4280, 2008.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemical Journal**, v.313, p.17-29, 1996.

WISPE, J. R. et al. Synthesis and processing of the precursor for human manganese-superoxide dismutase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.994, p.30-36, 1989.

WOODSON, K. et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) polymorphism, alpha-tocopherol supplementation and prostate cancer risk in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study (Finland). **Cancer Causes Control**, v.14, p.513-518, 2003.

YANG, B. et al. Relationship of electrochemical oxidation of catechins on their antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.49, p.747-751, 2001.

XU, Y. et al. An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. **DNA and Cell Biology**, v.18, p.709-722, 1999.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, p.337-349, 2002.

ZHANG, W. et al. UVB induced apoptosis drives clonal expansion during skin tumor development. **Carcinogenesis**, v.26, p.249-157, 2005.