

Luciana Regina Mangeti Barreto Mourão

**Efeito antioxidante do Ácido Indol-3-acético sobre fígado de camundongos
submetidos à hepatocarcinogênese induzida.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Mariza Pires de Melo

Pirassununga

2007

“Nunca deixe que alguém lhe diga que não pode fazer algo... Se tem um sonho, deve protegê-lo... Quando alguém não pode fazer algo, diz que VOCÊ não pode... Se quiser algo, vá atrás...Ponto final.”

(retirado do filme “A procura da Felicidade”)

Dedico esta conquista à...

Meu marido, meu cúmplice, companheiro e grande amor... Meu filho, meu anjo, minha força maior pra continuar lutando... Meus queridos e amados pais que estão vendo nessa minha conquista o resultado do que eles mesmos construíram, minha dignidade... Toda minha família, que de uma maneira ou outra, torceram por mim... Todos os meus amigos de verdade, que estavam sempre por perto e que, na verdade, são os irmãos que biologicamente não tive.

AGRADECIMENTOS

Ao nosso grande Pai Deus e ao Mestre Jesus por tanto amor e luz em todos os momentos.

À minha pequena grande família, Gerson, Gabriel, vó Toninha e vô Jair pela paciência e amor incondicional.

À minha orientadora e amiga Prof^a Dr^a Mariza Pires de Melo, por todos os ensinamentos, pela paciência e pela compreensão.

À amiga e colega de mestrado Silvana Marina Piccoli Pugine, pela ajuda, pelo profissionalismo, pelas experiências e pelo prazer de me tornar sua amiga.

Às estagiárias do laboratório de Química Biológica, Livia e Roberta pela grande ajuda e cumplicidade.

À equipe do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), pela ajuda, pela concessão dos animais, pelo uso do biotério e por todo apoio técnico. Um agradecimento em especial ao Lucas e ao Heidge, que com muita paciência, me ajudaram muito no meu experimento.

À Prof^a Dr^a Maria Lúcia Zaidan Dagli pelo apoio ao projeto e pela concessão dos laboratórios e apoio técnico.

Ao Prof. Dr. Flávio Meirelles por disponibilizar o espectro de dosagem de DNA.

À todos os amigos que felizmente fiz no decorrer do curso de mestrado.

À minha amiga Ana Luiza (Tia Ana banana) por toda a ajuda nos momentos de sufoco e nos momentos de alegria.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPESP pelo apoio financeiro.

À todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente.

Obrigada por tudo!!!

RESUMO

MOURÃO, L.R.M.B. Efeito antioxidante do ácido indol-3-acético sobre fígado de camundongos submetidos a hepatocarcinogênese induzida. 2007. 105 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

O ácido indol-3-acético (AIA) é uma auxina natural, metabólito do triptofano, e é produzido em células animal, vegetal e em alguns microrganismos podendo atuar como antioxidante. O objetivo do presente estudo foi o de avaliar o poder antioxidante do AIA, frente a um estresse oxidativo hepático induzido pelo hepatocarcinógeno dietilnitrosoamina (DEN). Foram utilizados camundongos BALB/c com dois meses. Em uma primeira etapa do estudo foram utilizados machos e fêmeas com o propósito de se avaliar somente o efeito do AIA administrado diariamente por 15 dias nas doses de 100, 200 e 500 mg/Kg de peso vivo. Em uma segunda etapa foram utilizados somente machos submetidos ao AIA (50, 250 e 500 mg/Kg de peso vivo) por 15 dias e no 16^o dia foram expostos ao DEN por 4 h ou por 24 h. Foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) evolução do peso e porcentagem relativa do fígado; 2) alterações metabólicas hepáticas avaliadas pelas atividades de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no soro; 3) perfil oxidativo hepático nas atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) e dos níveis de glutathiona reduzida e glutathiona oxidada e 4) fragmentação de DNA hepático. Os resultados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) com significância de 0,05 usando o teste de Tukey. O AIA não demonstrou efeito tóxico nas doses utilizadas tanto para machos quanto para fêmeas em nenhum dos parâmetros analisados, pois esses parâmetros não apresentaram diferença significativa em relação aos controles (apenas tampão fosfato salina, pH 7,4). A exposição dos animais ao DEN por 4 h demonstrou diminuição na atividade da CAT e GR em 30% e 23%, respectivamente em relação ao controle. O DEN induziu fragmentação de DNA, somente após 24 horas, correspondentes a 210, 410 e 610 pares de bases (pb). A atividade da CAT e GR nos animais que receberam AIA e expostos ao DEN por 4 h não apresentaram alteração significativa em relação aos controles. Porém, a administração de AIA protegeu, apenas parcialmente o DNA dos efeitos de

fragmentação causados pela exposição ao DEN por 24 horas, pois se observou uma redução dessa fragmentação em 42%, 51% e 48% para os fragmentos de 210 pb, em 54%, 56% e 55% para os fragmentos de 410 pb e em 51%, 57% e 53% para os fragmentos de 610 pb nos animais que receberam AIA nas respectivas doses de 50, 250 e 500 mg/Kg de peso vivo, em relação aos controles. Concluiu-se que o AIA nas doses administradas, não alterou a evolução do peso, massa relativa do fígado, atividade de ALT e AST e perfil oxidativo hepático dos animais, sugerindo que esta auxina, não é tóxica; e que o AIA promoveu a proteção do fígado dos animais frente aos efeitos deletérios causados pelo DEN, baseado na atividade das enzimas CAT e GR e fragmentação de DNA, demonstrando um efeito antioxidante dessa auxina.

Palavras-chave: auxina; hepatocarcinógeno; enzimas antioxidantes; fragmentação de DNA.

ABSTRACT

MOURÃO, L.R.M.B. **Antioxidant effect of the indol-3-acetic acid in liver of mice submitted to the induced hepatocarcinogenesis.** 2007. 105 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

The indol-3-acetic acid (IAA) is a natural auxin, metabolite of the tryptophane, is produced in animal cells, vegetable and in some microorganisms being to act like antioxidant. The objective of the present study was to evaluate the antioxidant effect of the IAA, facing a liver oxidative stress induced by the hepatocarcinogenic diethylnitrosoamine (DEN). Were utilized mice BALB/c with 2 months. In a first phase of the study were utilized males and females with the purpose of to evaluate only the effect of the IAA administered daily by 15 days in the doses of 100, 200 and 500 mg/Kg of body weight. In a second phase were utilized only males submitted to IAA (50, 250 and 500 mg/Kg of body weight) daily during 15 days and in the 16th day the animals were exposed to the DEN for 4 h or for 24 h. They were evaluated the following parameters: 1) evolution of the weight of the animals and the relative percentage of the liver; 2) liver metabolic alterations evaluated by the activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in the serum; 3) liver oxidative stress available by antioxidant enzyme activity as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) and by levels of the oxidized glutathione and reduced glutathione and 4) fragmentation of liver DNA. The results were analyzed by the analysis of variance (ANOVA) with significance at 0.05 using Tukey test. The IAA did not showed toxic effect in the doses utilized for both males and females for all analyzed parameters, those parameters did not shown significant difference to compare with the controls (only phosphate buffer saline, pH 7.4). The exposition of the animals to DEN for 4 h showed a reduction in the CAT and GR activity as 30% and 23%, respectively, compared with to the control. The DEN to induced DNA fragmentation, only after 24 hours of exposition, corresponding to 210, 410 and 610 pair of bases (pb). The activity of the CAT and GR in the animal treated with IAA and exposed to

DEN for 4 h did not show significant alteration to compare with the controls. However, the IAA administration was shown a partially protection of the DNA fragmentation from DEN exposition for 24 hours such as 42%, 51% and 48% for the fragments of 210 pb, 54%, 56% and 55% for the fragments of 410 pb and in 51%, 57% and 53% for the fragments of 610 pb by respectively IAA doses 50, 250 and 500 mg/Kg of body weight, compared with the controls. Concluded that the IAA in the doses administered, did not alter the evolution of the body weight, relative percentage of the liver, activity of ALT and AST and liver oxidative stress in animals, suggesting that this auxin is not toxic; and that the IAA promoted the protection of the liver of the animal facing the harmful effects caused by the DEN based in the activity of the CAT and GR activity and DNA fragmentation, showing an antioxidant effect of this auxin.

Keywords: auxin; hepatocarcinogenic; antioxidants enzymes; DNA fragmentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Biossíntese do ácido indol-3-acético a partir do aminoácido triptofano (MARCHIORO, 2005).....	22
Figura 2.	Estrutura química do <i>N</i> -nitrosodietilamina (DEN).....	27
Figura 3.	Eliminação de hidroperóxidos através das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) agindo sobre o substrato glutathione.....	33
Figura 4.	Interconversão de glutathione nas suas formas reduzidas e oxidada pela ação das enzimas glutathione peroxidase, glutathione oxidase e glutathione reductase (ROVER JÚNIOR; HÖERHR; VELLASCO, 2001).....	34
Figura 5.	Evolução individual do peso dos cinco camundongos macho de cada grupo, controle e nas três doses de AIA, durante o período de tratamento. Os cinco animais foram identificados pelos números 1, 2, 3, 4 e 5 em todos os grupos: (A)- animais controles; (B)- animais tratados com AIA na dose de 100 mg/Kg de peso vivo; (C)- animais tratados com AIA na dose de 200 mg/Kg de peso vivo; (D)- animais tratados com AIA na dose de 500 mg/Kg de peso vivo.....	54
Figura 6.	Evolução individual do peso dos cinco camundongos fêmea de cada grupo, controle e nas três doses de AIA. Os cinco animais foram identificados pelos números 1, 2, 3, 4 e 5 em todos os grupos: (A)- animais controles; (B)- animais tratados com AIA na dose de 100 mg/Kg de peso vivo; (C)- animais tratados com AIA na dose de 200 mg/Kg de peso vivo; (D)- animais tratados com AIA na dose de 500 mg/Kg de peso vivo.....	55

- Figura 7. Gráficos com os valores das médias das porcentagens relativas dos fígados dos animais calculadas pela relação entre o peso do fígado e o peso vivo para os machos e as fêmeas, controle (C) e nas três doses de AIA (100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 500 mg/Kg de peso vivo). Os resultados estão expressos como a média e desvio padrão para cinco animais por grupo..... 58
- Figura 8. Gráficos com os valores das médias das porcentagens relativas dos fígados dos animais calculadas pela relação entre o peso do fígado e o peso vivo para machos. (A)- controle (C) e as três doses de AIA (100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 500 mg/Kg de peso vivo). (B)- Controle (C), exposição ao DEN 4 horas (D4), e as três doses de AIA associadas à exposição ao DEN 4 horas (100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 500 mg/Kg de peso vivo); (C)- Controle (C), exposição ao DEN 24 horas (D24), e as três doses de AIA associado à exposição ao DEN 24 horas (100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 500 mg/Kg de peso vivo). Os resultados estão expressos como a média e desvio padrão para quatro animais por grupo..... 66
- Figura 9. Curva dose-resposta de AIA sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxidos dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). Os valores estão expressos como média e desvio padrão. Os resultados de SOD e CAT estão expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg de proteína})^{-1}$ e GR expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg de proteína})^{-1}$. Os resultados da atividade da GPx estão multiplicados por dez e expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg de proteína})^{-1}$ 71

- Figura 10. Fragmentação de DNA: (A)- padrão de DNA de 100 a 1000 pares de bases (pb); (B)- animal controle tratado com PBS; (C)- Animal tratado com AIA 50 mg/Kg de peso vivo; (D)- animal tratado com AIA 250 mg/Kg de peso vivo e (E)- animal tratado com AIA 500 mg/Kg de peso vivo. Os resultados representados pelas letras C, D e E caracterizam apenas um animal do referido grupo de estudo. Os resultados são ilustrativos de três repetições (n=3) em que todas apresentaram as mesmas características..... 74
- Figura 11. Efeito do DEN sobre a fragmentação de DNA: (A)- padrão de DNA de 100 a 1000 pares de bases (pb); (B)- animal controle tratado com PBS; (C)- animal submetido ao DEN e sacrificado após 4 horas; (D)- animal submetido ao DEN e sacrificado após 24 horas. As setas indicam o aparecimento de DNA fragmentado em 210, 410 e 610 pares de bases. Os resultados representados pelas letras C, D e E caracterizam apenas um animal do referido grupo de estudo. Os resultados são ilustrativos de três repetições (n=3) em que todas apresentaram as mesmas características..... 75
- Figura 12. Ação do AIA sobre o efeito do DEN na fragmentação de DNA expressa na região de 200 a 600 pares de bases (pb): (A)- padrão de DNA de 100 a 1000 pb ; (B)- animal controle tratado com PBS; (C)- animal tratado com AIA 50 mg/Kg de peso vivo; (D)- animal tratado com AIA 250mg/Kg de peso vivo, (E)- animal tratado com AIA 500 mg/kg de peso vivo; (F)- animal exposto ao DEN por 24 horas; (G)- animal tratado com AIA 50 mg/Kg de peso vivo e expostos ao DEN por 24 horas; (H)- animal tratado com AIA 250 mg/Kg de peso vivo e expostos ao DEN por 24 horas, (I)- animal tratado com AIA 500 mg/Kg de peso vivo e expostos ao DEN por 24 horas. As setas indicam o aparecimento de DNA

fragmentado em 210, 410 e 610 pares de bases. Os resultados representados pelas letras C, D e E caracterizam apenas um animal do referido grupo de estudo. Os resultados são ilustrativos de três repetições (n=3) em que todas apresentaram as mesmas características 77

Figura 13. Fragmentação de DNA expressa pela densidade de “pixel” na banda de 200 pares de bases (pb), 400 pb e 600 pb avaliada no DNA padrão, no DNA dos animais expostos ao DEN por 24 horas e no DNA dos animais tratados com AIA 50 (AIA 50 mg/DEN), 250 (AIA 250 mg/DEN) e 500 (AIA 500 mg/DEN) mg/Kg de peso vivo e expostos ao DEN por 24 horas. As análises foram realizadas utilizando o programa de computador Image-J para três géis de eletroforese como descrito na Figura 11. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão para três animais de cada grupo..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Número de animais na formação dos grupos controle (C) e dos que receberam AIA (50, 250 e 500 mg/Kg de peso vivo do animal) na ausência e presença de DEN por 4 horas (DEN-4h) ou por 24 horas (DEN-24h).....	44
Tabela 2.	Avaliação individual (1, 2, 3, 4 e 5) dos pesos dos fígados dos camundongos macho, controles e tratados com três doses de AIA (100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 500 mg/Kg de peso vivo), do peso vivo destes animais pesados no 16 ^o dia (antes do sacrifício) e a porcentagem relativa do fígado expressa como Fígado/PV(%) e determinada através da relação do peso do órgão e o peso vivo do animal.....	56
Tabela 3.	Avaliação individual (1, 2, 3, 4 e 5) dos pesos dos fígados dos camundongos fêmea, controles e tratados com três doses de AIA (100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 500 mg/Kg de peso vivo), do peso vivo destes animais e porcentagem relativa do fígado expressa como Fígado/PV(%) e calculada pela relação do peso do órgão e o peso vivo do animal.....	57
Tabela 4.	Efeito do AIA sobre a atividade da alanina aminotransferase (ALT) avaliada no soro de camundongos macho e fêmeas controles (C) e tratados com AIA nas doses de 100, 200 e 500 mg/Kg de peso vivo do animal.....	59
Tabela 5.	Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR) avaliadas em fígado de camundongos macho e fêmeas tratados com AIA nas doses de 100, 200 e 500 mg/Kg de peso vivo do	

	animal.....	60
Tabela 6.	Efeito do AIA sobre o nível de glutathiona reduzida (GSH; mmol/g de tecido úmido), glutathiona oxidada (GSSG; mmol/g de tecido úmido) avaliado em fígado de camundongos macho e fêmeas controles (C) e tratados com AIA nas doses de 100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 500 mg/Kg de peso vivo do animal.....	61
Tabela 7.	Avaliação individual (1, 2, 3 e 4) do peso vivo dos animais no 16 ^o dia, do peso do fígado e da porcentagem relativa do fígado (Fígado/PV(%), determinada pela relação do peso do fígado e peso vivo) dos animais controles (C) e tratados com AIA nas diferentes doses (50 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg de peso vivo).....	62
Tabela 8.	Avaliação individual (1, 2, 3 e 4) do peso vivo dos animais no 16 ^o dia, do peso do fígado e da porcentagem relativa do fígado (Fígado/PV(%), determinada pela relação do peso do fígado e peso vivo) dos animais controles (C), dos animais submetidos ao DEN por 4 horas (DEN-4h) e dos animais que foram submetidos ao DEN por 4 horas subseqüentemente ao tratamento com AIA nas doses de 50 (50 mg/Kg-DEN 4h), 250 (250 mg/Kg-DEN 4h) e 500 (500 mg/Kg-DEN 4h) miligramas de AIA por quilograma de peso vivo.....	63
Tabela 9.	Avaliação individual (1, 2, 3 e 4) do peso vivo dos animais no 16 ^o dia, do peso do fígado e da porcentagem relativa do fígado (Fígado/PV(%), determinada pela relação do peso do fígado e peso vivo) dos animais controles (C), dos animais submetidos ao DEN por 24 horas (DEN-24h) e dos animais que foram submetidos ao DEN por 24 horas (DEN-4h) subseqüentemente ao tratamento com AIA nas doses de 50 (50mg/Kg-DEN 24h), 250 (250mg/Kg-DEN 24h) e 500 (500 mg/Kg-DEN 24h) miligramas de AIA por quilograma de peso vivo.....	64

Tabela 10.	Valores de atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) avaliada no soro de camundongos macho controles (C) e tratados com AIA por via intragástrica nas doses de 50, 250 e 500 mg/Kg de AIA por quilograma de peso vivo, na ausência e presença de DEN por 4 horas (DEN-4h) e 24 horas (DEN-24h).....	67
Tabela 11.	Atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) avaliada em fígado de camundongos controles (C) e tratados com AIA nas doses de 50, 250 e 500 mg/Kg de peso vivo, na ausência e na presença de DEN por 4 horas (DEN-4h) e 24 horas (DEN-24h).....	70
Tabela 12.	Quantificação de DNA espectrofotometricamente dada pela absorbância em 260 nm (A260 nm) e 280 nm (A280 nm), razão das absorbâncias em 260 nm e 280 nm (A260/280), concentração de DNA (ng/μL) na amostra em fígados de animais controles (0) e tratados com ácido indol-3-acético (AIA) nas doses de 50, 250 e 500 miligramas por quilograma de peso vivo na ausência e presença de dietilnitrosamina (DEN) por 4 horas e 24 horas.....	73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Ácido indol-3-acético.....	21
2.2 <i>N</i> -dietilnitrosoamina e Hepatocarcinogênese	25
2.3 Estresse Oxidativo	28
2.4 Antioxidantes Naturais	36
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos Específicos.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Reagentes	41
4.2 Delineamento Experimental - Efeito do AIA em relação a dose resposta e hepatocarcinogênese induzida	41
4.3 Animais	41
4.4 Administração de ácido indol-3-acético	42
4.5 Indução da Hepatocarcinogênese	43
4.6 Protocolo Experimental.....	45
4.7 Coleta e Processamento das Amostras.....	45
4.8 Atividade da alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)	46
4.9 Perfil Oxidativo.....	46
4.9.1 Determinação de GSH e GSSG	47
4.9.2 Extração da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), gluta- tiona peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR)	48

4.9.3 Atividade máxima da Superóxido Dismutase (SOD)	48
4.9.4 Atividade máxima da Catalase (CAT)	49
4.9.5 Atividade máxima da Glutaciona Peroxidase(GPx).....	49
4.9.6 Atividade máxima da Glutaciona Redutase (GR).....	50
4.10 Determinação de proteínas totais	50
4.11 Fragmentação de DNA	51
4.11.1 Extração do DNA.....	51
4.11.2 Corrida eletroforética em gel de poliacrilamida	52
4.12 Análises Estatísticas	52
5 RESULTADOS	53
5.1 Primeira Etapa: Dose Resposta do Ácido Indol-3-Acético	53
5.2 Segunda Etapa: Avaliação do efeito da administração de AIA sobre a prevenção de hepatocarcinogênese induzida por DEN	61
5.3 Fragmentação de DNA	72
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÃO.....	89
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXO 1.....	104

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, no âmbito científico, é cada vez mais importante a procura de novos compostos com o objetivo de melhorar as defesas antioxidantes de sistemas biológicos bem como combater as espécies reativas de oxigênio (ERO), os responsáveis no processo de estresse oxidativo que é estabelecido quando a geração das ERO passa a ser superior às reservas antioxidantes do organismo.

A procura desses compostos antioxidantes é bastante intensa principalmente em plantas e em matérias primas naturais. Nesse sentido, as pesquisas são direcionadas tanto para humanos como também para animais, visando o bem estar e beneficiando a qualidade e produtividade dos mesmos.

Com relação à produtividade animal, o estresse oxidativo produz um resultado indesejado no que diz respeito à produtividade em si e à qualidade dos produtos gerados, pois nesse estado, há oxidação de moléculas importantes como proteínas, lipídios e DNA, além de interferir diretamente na resposta imunológica do animal. Esse estado de estresse oxidativo pode ser minimizado com dietas suplementadas com antioxidantes naturais ou sintéticos, por isso, há uma constante procura por esses compostos, principalmente os naturais, no intuito de diminuir essas ocorrências sem que seja tóxico ao animal.

Neste sentido, o objetivo do estudo apresentado nesta dissertação foi o de avaliar o poder antioxidante de um hormônio de crescimento de plantas, o ácido indol-3-acético (AIA), frente a um estresse oxidativo hepático induzido por dietilnitrosoamina (DEN) sem que o tratamento com esse hormônio apresente, no entanto, danos comportamentais ou metabólicos em camundongos; propondo um

modelo experimental para se avaliar as propriedades antioxidantes do referido produto em animais de laboratório.

Estudos *in vitro* mostram que o ácido indol-3-acético possui ação antioxidante semelhante a outros compostos indólicos como a melatonina e sua ação antioxidante têm demonstrado um papel importante na preservação de sêmen de animais, incluindo os animais de produção.

Em trabalhos recentes avaliaram-se uma possível ação antioxidante do AIA em fígado de ratos expostos ao tratamento intragástrico, uma vez que a administração de AIA diminuiu a atividade da catalase e glutathione peroxidase no fígado e reduziu também o nível de peroxidação lipídica neste órgão.

Sabe-se que no fígado é onde se encontra o maior arsenal de enzimas antioxidantes que são responsáveis por combater os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio, por isso para o estudo de possíveis compostos antioxidantes é importante avaliar sua ação no órgão em questão.

Estudos mostram que *N*-dietilnitrosamina induz hepatocarcinogênese mediada por espécies reativas de oxigênio e, portanto este composto é largamente utilizado como modelo para indução de hepatocarcinogênese experimental. Vários antioxidantes são eficientes sobre o estresse oxidativo hepático causado pelo DEN, incluindo os naturais como o guaraná (*Paullinea cupana* Mart. Var. *Sorbilis*), ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*), o ácido ascórbico e a melatonina.

Uma breve revisão bibliográfica abordando os assuntos referentes ao ácido indol-3-acético, *N*-dietilnitrosamina e hepatocarcinogênese, estresse oxidativo e antioxidantes naturais, tornou-se necessária para permitir a compreensão dos aspectos que se pretende estudar nesta dissertação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ácido Indol-3-acético

O ácido indol-3-acético (AIA) é a auxina natural que, produzida pelo vegetal, controla muitos de seus processos metabólicos. Como auxina, o AIA é largamente distribuído nos brotos, folhas jovens, flores e frutos das plantas. É um metabólito do aminoácido triptofano (Figura 1) e é produzido em células, animal, vegetal e em alguns microrganismos (GORDON; BARR; FRY 1972; MILLS; FINLAY; HADDAD 1991).

Em plantas, as auxinas ligam-se a uma proteína solúvel, e o complexo formado associa-se a um receptor de membrana. Os resultados dessa ligação são identificados no aumento da plasticidade da parede celular e alteração na permeabilidade celular (GALSTON; PURVES, 1960). Em casos de uso inadequado de auxinas sintéticas como herbicidas, o mecanismo de ação envolve os sistemas carboximetil celulase e RNA polimerase que influenciam respectivamente, na plasticidade da membrana celular e o metabolismo de ácidos nucléicos, resultando em aumento anormal de DNA, RNA e proteínas que conseqüentemente promovem a divisão descontrolada das células e o crescimento anormal das plantas (VARGAS et al., 2005).

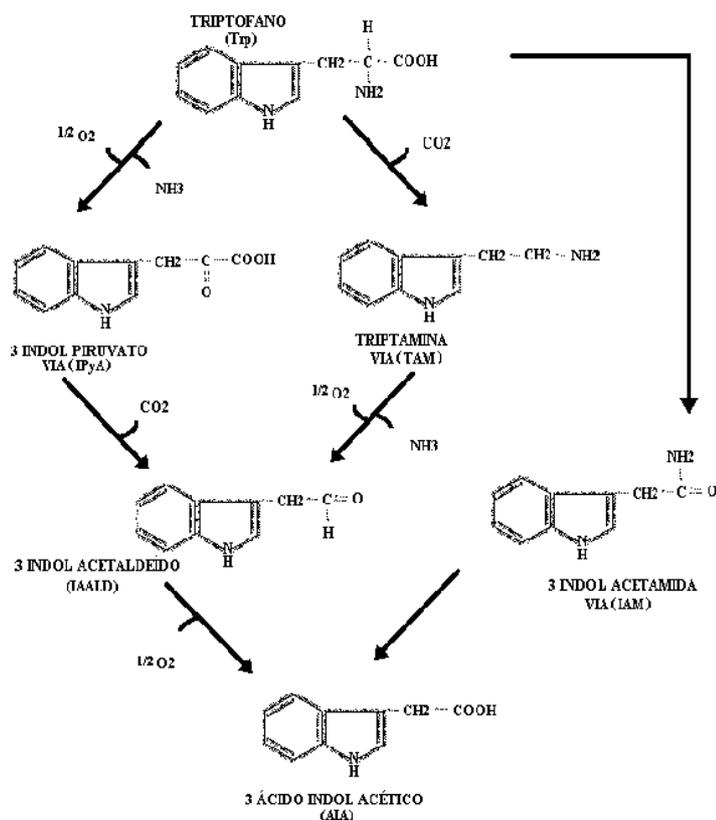


Figura 1. Biossíntese do ácido indol-3-acético a partir do aminoácido triptofano (MARCHIORO, 2005).

Esse hormônio vegetal AIA é frequentemente encontrado na água de coco e esta é muito utilizada em áreas como medicina, biotecnologia e nutrição. O AIA encontrado na água de coco, pode funcionar, como foi observado em alguns estudos, como conservante e diluente de sêmen de cães, pois confere aos espermatozoides um aumento na motilidade e vigor espermático (SALLES, 1989). A água de coco possui propriedades antioxidantes protetoras, provavelmente pela presença de vitamina C em sua composição, embora mais de um princípio ativo possa estar envolvido (CARVALHO et al., 2006). Uchoa et al. (2002) relataram a ação benéfica do AIA em espermatozoides caprinos, facilitando sua conservação, além do aumento da motilidade e, conseqüente, o incremento da fertilidade. Foram

também encontrados resultados positivos na conservação de sêmen suíno na presença de AIA (TONIOLLI et al., 1996), provavelmente por sua ação antioxidante.

O AIA é encontrado na urina de seres humanos como um produto do metabolismo do triptofano e também em líquido cerebrospinal (HU; DRYHURST, 1997), sangue (MARTINEZ et al., 1983), e em vários órgãos tais como pulmão, rim, fígado, e cérebro (WEISSBACH et al., 1959; TUSSELL et al., 1984). É predominantemente formado como resultado da ação da monoamina-oxidase mediada pela desaminação oxidativa de triptamina, um neurotransmissor ou neuromodulador do Sistema Nervoso Central, semelhante ao proposto na figura 1 (ADELL et al. 1983). O AIA em sistemas orgânicos, induz citotoxicidade em fibroblastos (FOLKES et al., 1999), neutrófilos (DE MELO; LIMA; CURI 2004), e vários tipos de câncer (GRECO et al., 2002).

Andrade et al. (2005) puderam observar em seus trabalhos com cultivo *in vitro* de folículos pré antrais de ovinos, que há uma relação dose resposta do AIA no crescimento desses folículos. Na dose de 40 ng/mL de AIA, administrado no cultivo desses folículos, foi observado ativação e crescimento folicular após dois dias. Essa concentração dessa auxina é a mesma encontrada na água de coco (DUA; CHANDRA, 1993). Porém, nas concentrações de 500 ng/mL e 1000 ng/mL de AIA, houve uma redução da porcentagem de folículos normais cultivados por apenas dois dias (ANDRADE et al., 2005).

Espécies reativas de oxigênio podem se formar durante a peroxidação do AIA catalisada por peroxidase, gerando produtos citotóxicos (DE MELO et al., 1992) o que pode ocasionar efeitos moderadamente tóxicos em neutrófilos e macrófagos cultivados na presença dessa auxina (DE MELO et al., 1998).

A citotoxicidade do ácido indol-3-acético (DE MELO et al., 2004a, 2004b e 1997; FOLKES; WARDMAN, 2001) é totalmente evidente quando na presença de peroxidase – seja a peroxidase de raiz forte proveniente de rábano ou a mieloperoxidase de neutrófilos - pois age como um oxidante avaliado pelo aumento da formação das espécies reativas de oxigênio (CANDEIAS et al., 1995; CANDEIAS; WRDMAN; MASON 1997; ESCOBAR; VÁSQUEZ-VIVAR; CILENTO 1992), e também pela indução da peroxidação lipídica e lesões em ácidos nucleicos (FOLKES et al., 1999).

A ação protetora do ácido indol-3-acético sobre a conservação de sêmen de alguns animais ressalta o fato de uma possível ação antioxidante desta auxina, quando na ausência de peroxidase (CARVALHO et al., 2006). Estudos realizados nessa linha, relataram o efeito da administração de AIA na função e estresse oxidativo de neutrófilos e constataram que a atividade fagocitária dessas células por partículas de Zymosan aumentou significativamente (51% em relação ao controle) em ratos que receberam AIA por via subcutânea ou intragástrica; sendo que a geração de H₂O₂ por essas células não foi alterada pela administração da auxina (LINS et al., 2006; PUGINE et al., 2007). O Zymosan é um polissacarídeo insolúvel de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* que ativa a cascata alternativa de complemento e induz citocinas próinflamatórias em células do sistema imune (SATO, et al., 2003) e é utilizado para muitos estudos fisiológicos e imunológicos.

Ainda nessa linha de pesquisa, Oliveira et al., 2007 puderam observar que, em fígados de ratos que receberam AIA por via subcutânea ou intragástrica (gavagem), essa auxina não produziu nenhuma ação oxidante e nem mesmo observaram diferença entre as duas vias de administração. Concomitantemente,

observaram uma redução na atividade da enzima catalase, o que sugere uma possível ação antioxidante do AIA nesse órgão.

2.2 N-dietilnitrosoamina e Hepatocarcinogênese

Em uma hepatocarcinogênese experimental, o agente carcinogênico pode ter várias origens como vírus, radiação e substâncias químicas. No caso de uma carcinogênese química, é durante a biotransformação do carcinógeno que ocorre a formação e o aparecimento de espécies reativas de oxigênio pela cadeia respiratória mitocondrial, instalando-se então, um estresse oxidativo no órgão alvo. Juntamente com a instalação desse estresse, ocorre a metabolização do carcinógeno, causando danos adicionais ao DNA (ARRANZ et al., 2006). Com isso, é possível dizer que a biotransformação/bioativação de um carcinógeno no organismo, sendo este endógeno ou exógeno, é o fator que controla sua atividade carcinogênica. Essa atividade carcinogênica altera a expressão de genes e/ou a atividade de enzimas relevantes para modificação estrutural e conseqüente inativação desses carcinógenos. Esses fatores influenciam diretamente sobre as conseqüências da carcinogênese iniciada quimicamente (CHEN; KONG, 2004).

A carcinogênese química pode ser induzida por carcinógenos diretos ou indiretos. Os carcinógenos diretos são substâncias alquilantes ou acilantes com atividade eletrofílica intrínseca, enquanto os indiretos são metabolizados para compostos ativos eletrofílicos durante o processo de biotransformação (OLIVEIRA, 2007).

A carcinogênese química passa por três estágios de transformação celular até se instalar completamente:

Primeiro estágio: é chamada de iniciação e consiste na exposição inicial ao carcinógeno, como também a distribuição e transporte a órgãos e tecidos dando início a ativação metabólica com formação de espécies reativas e subsequente dano genotóxico (SURH, 2003).

Segundo estágio: se caracteriza pela promoção do tumor a partir das células iniciadas e, agora, geneticamente alteradas com relação a sua expressão gênica e que regulam a diferenciação e a proliferação celular, alterando esses eventos. Esse estágio pode ser modulado pelo agente promotor, idade do animal usado no experimento, composição e quantidade de dieta (DRAGAN; PITOT, 1992).

Terceiro estágio: chamado de progressão se caracteriza pela sua instabilidade genômica e incessante evolução para formação neoplásica, estando diretamente ligado ao aumento alterado de crescimento celular, à capacidade invasiva, ao crescimento autônomo e às alterações bioquímicas nas células malignas (PITOT; DRAGAN, 1991).

Há muito tempo, pesquisadores vêm utilizando o fígado, como órgão, para indução de carcinogênese química experimental (ESPANDIARI et al., 2005). Desde então o estudo sobre a etiologia e histopatogênese dos tumores hepáticos experimentais tem tido grande importância provavelmente pelo fato de que os carcinógenos com ação em humanos, agem também em animais de experimentação (CLAYSON; ARNOLD, 1991). Por isso, o uso de carcinógenos químicos em roedores para indução de câncer, é considerado um indicador válido de risco de câncer para o homem (ENGELBERGS; THOMALE; RAJEWSKY 2000).

Os modelos de indução de hepatocarcinoma mais citados na literatura utilizam um hepatocarcinógeno químico: dietilnitrosamina ou *N*-nitrosodietilamina (Figura 2) (FAUSTO et al. 1999). Este importante hepatocarcinógeno é um agente alquilante do DNA que é rapidamente metabolizado a substâncias reativas que interagem com o DNA e dá origem a células que, a partir desse evento, carregam alterações genéticas e que se proliferam após o início do processo neoplásico (DEAL; RICHARDSON; SWENBERG 1989).

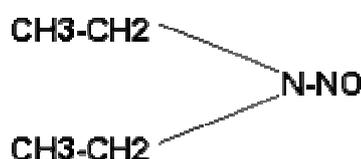


Figura 2. Estrutura química do *N*-nitrosodietilamina (DEN)

Outro ponto importante da utilização do *N*-nitrosodietilamina (DEN) como indutor de hepatocarcinogênese é o fato do mesmo ser encontrado numa larga variedade de alimentos como queijo, grão de soja, fumo, peixe salgado e desidratado, carne curada e bebidas alcoólicas (LIAO et al., 2001). No processo de metabolismo de certas drogas terapêuticas, também acontece a formação de dietilnitrosamina (AKINTONWA, 1985), assim como também é encontrado na fumaça do tabaco (IARC, 1972).

O dietilnitrosamina sofre ativação metabólica por isozimas do sistema monoxigenase do citocromo P450 formando espécies reativas de oxigênio que causam uma tensão oxidativa e pode levar a citotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade. Esse composto também pode exercer seu poder carcinógeno, gerando DNA aductos, que são formas modificadas de DNA que podem voltar a sua

estrutura original, porém no momento da regeneração, podem acontecer mutações em sua estrutura, o que proporciona à molécula diferenças importantes na proliferação e expressão gênica (FUKUMASU et al, 2006). O fato de o dietilnitrosamina estar presente em produtos alimentícios comumente consumidos se faz necessário o desenvolvimento de drogas efetivamente hepatoprotetoras com potente atividade antioxidante (PRADEEP et al, 2007).

Vários antioxidantes mostram-se eficientes sobre o estresse oxidativo causado por agentes carcinógenos químicos como o DEN, incluindo os naturais como o guaraná (*Paullinea cupana* Mart. Var. *Sorbilis*) (FUKUMASU et al., 2006) e ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*) (DA SILVA et al., 2005) e o ácido ascórbico (LIU et al., 2006). O guaraná é citado na literatura como um anti-neoplásico natural, uma das hipóteses dessa ação é a presença de substâncias como a cafeína, taninos, catequinas e outros (FUKUMASU et al., 2005).

2.3 Estresse Oxidativo

Os mamíferos possuem uma notável habilidade de adaptação a vários tipos de estresse a que são submetidos. Por isso, frente a um estresse oxidativo, o organismo lança mão de várias formas de defesa, desenvolvendo um sistema antioxidante, uma maneira de se adaptar e manter a homeostase. Nesse sentido, qualquer estímulo que leve a produção excessiva de espécies reativas e/ou à depleção de antioxidantes, conduz a uma alteração significativa do balanço entre a

produção e remoção de espécies reativas como os radicais livres (DRÖGE, 2002; URSO; CLARKSON, 2003).

Um radical livre tem como definição qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula com um elétron não pareado ocupando uma órbita externa, como ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o óxido nítrico ($NO\cdot$), por exemplo. Entretanto, ainda existem outros compostos igualmente reativos que não possuem um elétron desemparelhado na última camada, que incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o cátion nitrosonium (NO^+), o ânion nitroxila (NO^-) e o peroxinitrito ($OONO^-$); porém, classificando de uma forma mais ampla, tanto um grupo quanto o outro podem ser chamados de espécies reativas (DRÖGE, 2002).

Entre as ERO, o mais potente oxidante em sistemas biológicos é o radical hidroxil, com um tempo de vida extremamente curto (1×10^{-9} s) e com alta reatividade a uma grande variedade de moléculas orgânicas, pois necessita somente de mais um elétron para se estabilizar (YU, 1994; ROVER JÚNIOR; HÖ; VELLASCO 2001). Se o radical hidroxil, for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas levando à inativação ou mutação desse DNA, pois esse radical combina com extrema rapidez ao metal ou até mesmo a outros radicais. O radical hidroxil pode também iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

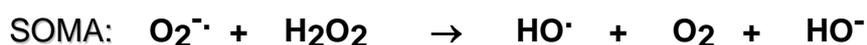
Os metais de transição, como o ferro e o cobre, tem confirmada ação catalítica na formação de lesões oxidativas decorrentes da produção de radical hidroxil (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990); sendo que o ferro é o metal mais abundante no organismo por atuar como cofator importante para várias proteínas. Tanto na reação de Fenton quanto na reação de Haber-Weiss forma o radical

hidroxil com a efetiva participação do ferro ou do cobre (FERREIRA; MATSUBARA, 1997):

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:



Quando acontece o desbalanço da quantidade produzida de ERO e a remoção destes pelos sistemas antioxidantes, se tem então um estresse oxidativo, causador de danos moleculares às estruturas celulares com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais (DRÖGE, 2002). Esses danos podem ser observados em diversos tecidos e órgãos tais como fígado, músculo e tecido adiposo (BARJA DE QUIROGA, 1992; GOLDFARB, 1993), vascular (DUARTE et al., 1993; FENSTER et al., 2002) e cerebral (SIGNORINI; SIGNORINI, 1993; HALLIWEL, 1994; KEYNES; GARTHWAITE, 2004).

Por um lado as ERO oxidam importantes estruturas celulares como as macromoléculas, por outro lado também participam do sistema de defesa contra uma infecção em que os fagócitos estimulados produzirem ERO com a finalidade de destruir o microrganismo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; POULSEN et al., 2000).

Sabe-se que as ERO estão envolvidas em vários processos fisiológicos, assim como em vários eventos patológicos como mutação de DNA, carcinogênese,

envelhecimento, arterosclerose, danos por radiação, inflamação, diabetes *mellitus*, doenças neurodegenerativas e injúrias tóxicas, incluindo toxicidade aguda e crônica por álcool (DAS; VASUDEVAN, 2007).

O ácido indol-3-acético, em estudos *in vitro*, mostrou possuir ação antioxidante semelhante a outros compostos indólicos (CANO; ALCARAZ; ARNAO 2003) como a melatonina (KARBOWNIK et al., 2000; CELIK et al., 2006). Ohta et al. (2004) observaram que a melatonina pôde prevenir lesões agudas induzidas por tetracloreto de carbono (CCl₄) em fígado de ratos, atenuando a aumentada peroxidação lipídica e reduzindo a depleção da glutathiona em sua forma reduzida. Esses mesmos autores puderam concluir que, doses terapêuticas de melatonina, por uma única vez pós-tratamento com CCl₄, atenuaram o decréscimo da concentração de ácido ascórbico e da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathiona redutase, além de aumentar a atividade de xantina oxidase em fígado de ratos submetidos a esse tratamento. Esses dados sugerem que este composto indólico exerce um efeito terapêutico antioxidante em danos agudos causados no fígado pelo excesso de ERO e peroxidação lipídica induzida.

As enzimas antioxidantes fazem parte da primeira linha de defesa contra a toxicidade das ERO no organismo (RODRIGUEZ et al., 2004). Cada enzima antioxidante é responsável por uma ação protetora específica contra as ERO:

1. Linha de proteção que atua como detoxificadora dos agentes antes de causar a lesão;
 - As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), os metabólitos da glutathiona reduzida (GSH) e Vitamina E;

2. Linha de defesa que tem a função de reparar a lesão ocorrida;

- As enzimas glutathione redutase (GR), GPx, os metabólitos ácido ascórbico e GSH (FERREIRA et al., 1997).

Os agentes que protegem as células contra os efeitos das espécies reativas de oxigênio podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (SIES, 1993). O sistema enzimático é constituído por várias enzimas, entre elas: SOD, CAT, GPx e GR (HALLIWELL, 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004). O sistema não enzimático pode ser classificado em endógeno (bilirrubina, melatonina, ácido úrico, coenzima-Q e outros produtos metabólicos) e os exógenos (α -tocoferol, ácido ascórbico, polifenóis, selênio e outros obtidos através da dieta) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004).

A seguir será apresentado, simplificadamente, como a linha de defesa das enzimas antioxidantes pode atuar:

- A superóxido dismutase é encontrada em duas formas de isoenzimas, principais, a Cu-Zn-SOD atuando principalmente no citosol e a Mn-SOD que atua na matriz mitocondrial (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004). A SOD reduz o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (equação 1) (SIES, 1993; HALLIWELL, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004).



- A catalase é uma enzima encontrada basicamente nos peroxissomas das células animais e possui em sua estrutura o Fe^{3+} , que compõem o grupo

prostético heme da proteína, importante para efetuar a reação catalítica. A função da catalase é reduzir o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (equação 2) (SIES, 1993; HALLIWELL, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004).



- A glutathiona peroxidase e a glutathiona redutase agem em conjunto eliminando os hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos. A GPx e a GR estão distribuídas tanto no citosol quanto na mitocôndria das células (JI et al., 1988). A GPx possui uma característica importante, apresentando um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado. A atividade da GPx está relacionada ao consumo do co-substrato GSH que é convertido em GSSG. E, a regeneração do GSH no meio celular é efetuada pela GR tendo como participante o NADPH (Figura 3) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004).

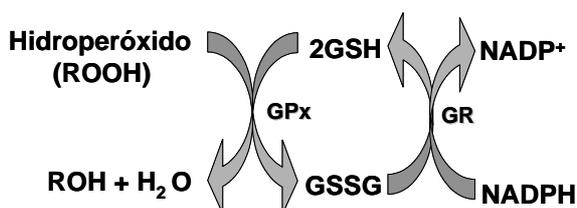


Figura 3. Eliminação de hidroperóxidos através das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) agindo sobre o substrato glutathiona.

É possível se observar a importância do tripeptídeo glutatona em todo o processo de defesa antioxidante envolvendo o ciclo enzimático das glutatonas e a Figura 4 (explicativa da Figura 3) apresenta como esse importante processo acontece simultaneamente:

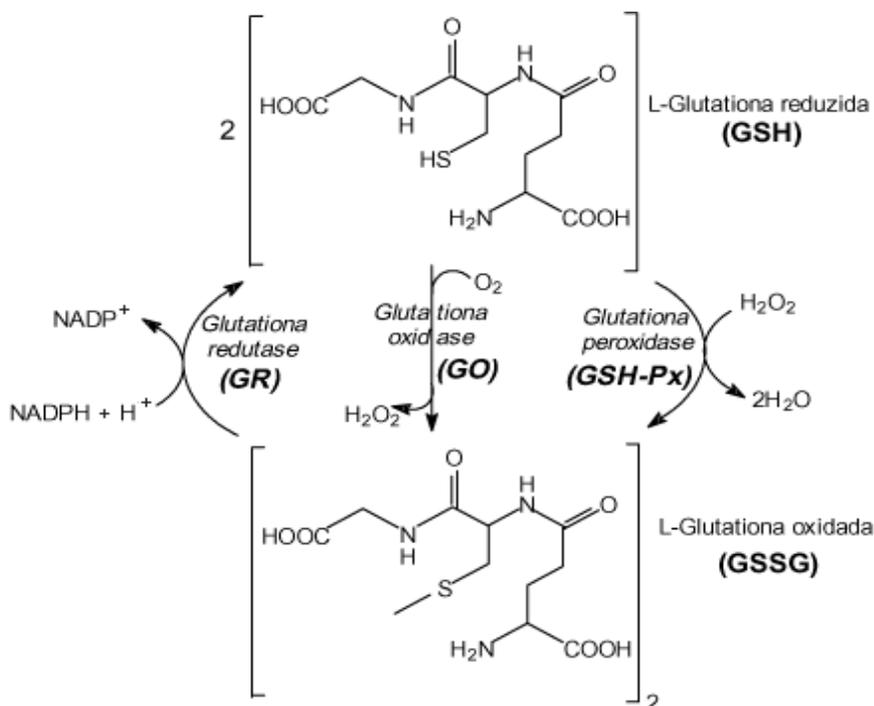


Figura 4. Interconversão de glutatona nas suas formas reduzidas e oxidada pela ação das enzimas glutaciona peroxidase, glutaciona oxidase e glutaciona redutase (ROVER JÚNIOR; HÖERHR; VELLASCO, 2001).

No momento do estresse oxidativo, com a atividade efetiva das enzimas antioxidantes, ocorre produção de GSSG e depleção de GSH. Porém, com o excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema antioxidante, haverá um desequilíbrio favorecendo a produção de GSSG e consumo de GSH, fato que também caracteriza o estresse oxidativo assim como sua magnitude. Por isso, a razão GSSG/GSH, deve ser monitorada por sistemas de medição. Beehler et al.

(1989), observaram que em pulmões de ratos submetidos à hiperoxia por 48 horas, esta razão está significativamente aumentada quando comparada a de grupo controle não expostos.

Em virtude da importante linha de defesa a qual fazem parte essas enzimas antioxidantes, é que se faz necessário ressaltar a mensuração de suas atividades catalíticas, em conjunto com a mensuração dos níveis de GSH e GSSG. Outros parâmetros para se avaliar o estresse oxidativo em material biológico são, dentre outros, os conteúdos de peroxidação lipídica e fragmentação de DNA.

Assim como a relação GSSG/GSH, também há a importância de analisar a peroxidação lipídica, já que todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, mas a membrana é um dos mais atingidos em decorrência dessa peroxidação. Quando a peroxidação lipídica, produzida pelas ERO atinge a membrana celular, acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (MELLO-FILHO; HOFFMAN; MENEHINI 1983). Em virtude disso, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, e também formação de produtos citotóxicos (malonaldeído), culminado com a morte celular (HERSHKO, 1989).

Da mesma forma e importância, para a detecção do grau de estresse oxidativo causado pelas ERO ou até mesmo pelos tratamentos administrados a um animal, se faz necessário também a determinação da fragmentação de DNA. As ERO fazem parte da lista de agentes que levam danos ao DNA, assim como produtos de peroxidação lipídica ou agentes alquilantes, entre outros. Fujimoto et al. (1984), testaram hidroperóxidos resultantes da oxidação do metil linolato e linolenato na presença de metais e agentes redutores (cisteína e ácido ascórbico), pois, nessa condição, os hidroperóxidos são facilmente decompostos, e observaram como

resultado, a formação de uma grande variedade de compostos carbonílicos e espécies reativas de oxigênio que podem reagir com o DNA.

2.4 Antioxidantes Naturais

Em virtude de todos os danos trazidos pelo estresse oxidativo, a procura por antioxidantes exógenos que revertam ou protejam esse processo é intensa, principalmente se este for componente de alimentos naturais como frutas e plantas.

Existem vários compostos antioxidantes presentes na dieta que possuem importantes funções no processo de retardamento de doenças como câncer, e demais doenças crônicas (CHUN et al., 2005). A alimentação rica em vitaminas C e E, por exemplo, é um método antioxidante importante de prevenção contra essas doenças.

Os sistemas antioxidantes também estão presentes nas plantas que, através de metabolismos especiais, produzem substâncias como: taninos, fenóis, alcalóides, lignanas, cafeínas e aminas (LARSON 1988; COTELLE, 1996; OKADA; KANEKO; OKAJIMA, 1996). Assim, alguns desses compostos fenólicos de plantas, por exemplo, possuem como propriedade antioxidante, eliminar radicais livres e/ou espécies reativas e quelar metais reativos (CHUN et al., 2005).

A própolis é um desses compostos que contém, em sua composição, polifenóis que conferem a esse composto, atividade antioxidante. Além dos polifenóis, a própolis contém vários outros compostos com a propriedade de removerem radicais livres em excesso (MENEZES, 2005). Outros pesquisadores

atribuem a CAPE (*Caffeic Acid Phenethyl Ester*), um composto fenólico da própolis, essa propriedade antioxidante. Porém, Russo , Longo e Vanella (2002) constataram que mesmo com a remoção da CAPE, extratos de própolis continuaram a apresentar atividade antioxidante.

Chun et al. (2005) demonstraram em seus estudos que ervas como orégano alecrim, tomilho e menta, possuem relevantes aplicações antioxidantes por possuírem alto conteúdo de compostos fenólicos e constataram que, utilizando o óleo de um tipo específico de orégano, obtiveram ação antimicrobiana a *Helicobacter pylori*, uma bactéria estomacal responsável por um tipo crônico de gastrite.

Demais pesquisadores também no intuito de encontrar compostos antioxidantes em matérias primas naturais continuam suas buscas. Melo et al. (2003) observaram em seus estudos que o coentro *Coriandrum sativum L.*, uma especiaria muito usada no Brasil, possui tanto em seu extrato etéreo como no extrato aquoso, um grande potencial antioxidante atribuído principalmente a seus compostos fenólicos e seus carotenóides.

As características estruturais dos compostos orgânicos com atividades antioxidantes são os fatores que governam essa atividade e incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos como flavonóides, fenilpropanóides e outros compostos aromáticos (CHUN et al., 2005). Corsino et al. (2003) observaram uma ação antioxidante em infusões de folhas de *Maytenus Aquifolium*, uma árvore selvagem proveniente do cerrado brasileiro que é largamente usada no tratamento de úlcera gástrica. Seu poder antioxidante protege a mucosa estomacal das espécies reativas de oxigênio formadas no processo crônico da gastrite e posterior úlcera gástrica.

Várias substâncias também são estudadas para a quimioprevenção do câncer e os antioxidantes naturais são regularmente escolhidos como uma dessas substâncias. O guaraná *Paullinia cupana*, uma planta originária do Brasil, possui uma alta concentração de taninos, um produto secundário do metabolismo de várias plantas (DESHPANDE et al., 1984). Um recente trabalho de Fukumasu et al. (2007) demonstrou que o guaraná atua suprimindo a carcinogênese química induzida pelo *N*-nitrosodietilamina.

Em vários estudos há relatos da suplementação de dietas com antioxidante para animais de produção e são apontados melhores resultados na produção e na qualidade dos produtos gerados.

Na dieta de suínos o uso de selênio traz vantagens de comercialização, principalmente se o produto for fornecido ao leitão recém nascido, pois no suíno em crescimento, a incorporação de selênio aos músculos é muito mais eficiente se for fornecido por selênio orgânico. Essa suplementação faz com que os animais ganhem uma proteção antioxidante, prolongando a boa coloração da carne e aumentando a vida de prateleira (ALVES et al., 2006).

A adição de antioxidantes como vitamina A, vitamina E (α -tocoferol), vitamina D3 e selênio na dieta de bovinos leiteiros reduzem o nível de produtos da peroxidação lipídica no leite (CASTILLO et al., 2005; PASCHOAL; ZANETTI; CUNHA, 2006). Outros autores observaram que suplementação com vitamina E, β -caroteno, luteína e zeaxantina são capazes de retardar a oxidação de proteínas no leite bovino (HAVEMOSE et al., 2004). Demais trabalhos relatam ainda que, novamente, a suplementação com vitamina E para vacas leiteiras, no pré e pós parto, melhora a atividade das células fagocitárias, prevenindo a incidência de mastite clínica (POLITIS et al. 1995; NDIWENI; FINCH, 1996; VALLE, 2005).

Com o objetivo de melhorar a conservação da carne, outros autores observaram que o uso de antioxidantes como vitamina E, vitamina C e ácido lipóico, entre outros, na dieta de animais de corte, promove maior estabilidade da cor e menor oxidação dos lipídeos da carne (LAURIDSEN et al., 1999; HARRIS et al., 2001; ROWE et al., 2004; RENTFROW et al., 2004; BEKHIT et al., 2005). Ainda com relação a conservação da carne, foi relatado que a suplementação com antioxidantes na dieta de animais de corte, pode ser uma alternativa viável para minimizar a oxidação de lipídios e proteínas induzida pela irradiação da carne (DOGBEVI; VACHON; LACROIX, 1999; LACROIX, 2002; AHN, 2003; BREWER, 2004; PLACEK et al., 2004).

Com isso, pode-se dizer que a suplementação alimentar com antioxidantes, principalmente os naturais, constituem-se em uma linha importante para a pesquisa atual e neste contexto a busca por novos compostos com atividades antioxidantes adquire relevância.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do ácido indol-3-acético como um antioxidante na proteção do fígado submetido a um estresse oxidativo induzido.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a ação não tóxica e antioxidante de diferentes doses de ácido indol-3-acético com e sem estresse oxidativo induzido por N-dietilnitrosamina através de:

- Análise da atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase; catalase; glutathione peroxidase e glutathione reductase;
- Análise da atividade das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, marcadoras de disfunção hepática;
- Análise da viabilidade celular através de perfil oxidativo como dosagem de glutathione reduzida e glutathione oxidada;
- Geração de fragmentação de DNA;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Todos os reagentes são de grau analítico e foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.2 Delineamento experimental – Efeito do AIA em relação dose resposta e prevenção de hepatocarcinogênese induzida

O experimento foi dividido em duas etapas:

1ª etapa - efeito dose-resposta do AIA;

2ª etapa - efeito do AIA na prevenção de hepatocarcinogênese induzida por N-nitrosodietilamina.

4.3 Animais

Todos os animais foram da linhagem BALB/c com dois meses de idade, mantidos em biotério com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12/12

horas. Os animais foram criados e mantidos durante os experimentos no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) em colaboração com a Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($20 \pm 4^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar (45-65%).

O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em agosto de 2006 sob o protocolo n^o. 952/2006, (projeto: *Avaliação dos efeitos antioxidantes do ácido indol-3-acético na hepatocarcinogênese induzida*) (ANEXO 1).

4.4 Administração de ácido indol-3-acético

1^a etapa: os camundongos foram divididos em oito grupos com 5 animais cada um sendo 4 grupos de machos e 4 grupos de fêmeas: i) grupo controle que recebeu 1mL de tampão fosfato salina, pH 7,4 (PBS); ii) grupo que recebeu solução de AIA 100 mg/Kg de peso vivo do animal; iii) grupo que recebeu solução de AIA 200 mg/Kg de peso vivo do animal e iv) grupo que recebeu solução de AIA 500 mg/Kg de peso vivo do animal. Os animais foram tratados diariamente por 15 dias;

2^a etapa: os camundongos macho foram divididos em quatro grupos de 12 animais cada um, de acordo com a dose administrada de AIA, diariamente por 15 dias: i) grupo controle que recebeu 1mL de PBS; ii) grupo que recebeu solução de AIA 50 mg/Kg de peso vivo do animal; iii) grupo que recebeu solução de AIA 250

mg/Kg de peso vivo do animal e iv) grupo que recebeu solução de AIA em PBS 500 mg/Kg de peso vivo do animal,

4.5 Indução da Hepatocarcinogênese

Apenas os animais da segunda etapa foram submetidos à indução de hepatocarcinogênese por períodos de quatro horas ou 24 horas.

O modelo experimental de indução de hepatocarcinogênese foi efetuado por *N*-nitrosodietilamina (DEN) na dose de 160 µg/g de peso vivo dissolvido em solução salina fisiológica (0,9%) (FUKUMASU et al., 2006) Esta dose promove alta lesão nos hepatócitos após três horas (FUKUMASU et al., 2006).

No 16^o dia de experimento, os 12 animais que compuseram cada um dos quatro grupos formados de acordo com a dose administrada de AIA foram subdivididos da seguinte maneira: quatro animais não foram expostos ao DEN, quatro animais foram expostos ao DEN por quatro horas e os outros quatro animais foram expostos ao DEN por 24 horas (Tabela 1). Os grupos formados nesta etapa foram:

- 1) Grupo controle que recebeu apenas tampão fosfato salina, pH 7,4 (PBS), ou seja, não receberam nem o AIA e nem o DEN;
- 2) Grupo controle exposto ao DEN por 4 horas;
- 3) Grupo controle exposto ao DEN por 24 horas;
- 4) Grupo que recebeu apenas AIA 50 mg/Kg de peso vivo;

- 5) Grupo que recebeu AIA 50 mg/Kg de peso vivo e exposto ao DEN por 4 horas;
- 6) Grupo que recebeu AIA 50 mg/Kg de peso vivo e exposto ao DEN por 24 horas;
- 7) Grupo que recebeu apenas AIA 250 mg/Kg de peso vivo;
- 8) Grupo que recebeu AIA 250 mg/Kg de peso vivo e exposto ao DEN por 4 horas;
- 9) Grupo que recebeu AIA 250 mg/Kg de peso vivo e exposto ao DEN por 24 horas;
- 10) Grupo que recebeu apenas AIA 500 mg/Kg de peso vivo;
- 11) Grupo que recebeu AIA 500 mg/Kg de peso vivo e exposto ao DEN por 4 horas e
- 12) Grupo que recebeu AIA 500 mg/Kg de peso vivo e exposto ao DEN por 24 horas.

Tabela 1. Número de animais na formação dos grupos controle (C) e dos que receberam AIA (50, 250 e 500 mg/Kg de peso vivo do animal) na ausência e presença de DEN por 4 horas (DEN-4h) ou por 24 horas (DEN-24h).

DEN	Tratamento AIA mg/Kg de peso vivo			
	C	50	250	500
Ausência	4	4	4	4
Presença 4h	4	4	4	4
Presença 24h	4	4	4	4

4.6 Protocolo Experimental

Experimentos da 1ª etapa: Nessa etapa, foi coletado sangue dos animais controles e dos que receberam AIA (100, 200 e 500 mg/kg de peso vivo do animal) para determinação de atividade da alanina aminotransferase (ALT). Também foram coletadas amostras de fígado para a determinação da atividade de enzimas antioxidantes e conteúdo de glutatona oxidada e reduzida.

Experimentos da 2ª etapa: Foi coletado o sangue dos animais controles e dos que receberam AIA (50, 250 e 500 mg/Kg de peso vivo do animal) expostos e não expostos ao DEN. No soro foi determinada atividade da alanina aminotrasferanse (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Foram coletadas amostras de fígado para a determinação da atividade de enzimas antioxidantes, conteúdo de glutatona oxidada e reduzida e fragmentação de DNA.

4.7 Coleta e Processamento das Amostras

Amostras de sangue foram obtidas no momento da eutanásia de todos os grupos através de punção cardíaca, utilizando-se seringa de 1mL e agulha 12,7 mm x 0,33 mm. O sangue foi coletado em tubos plásticos de 2 mL e imediatamente acondicionado em gelo. Após o término da coleta foram centrifugadas por 15 minutos a 800 x g para obtenção do soro. Este último foi aliqotado e armazenado, a -40°C, até a realização das análises bioquímicas.

As amostras de fígado foram dissecadas, divididas em partes e cada parte envolvida em papel alumínio indentificado, para acondicionamento em nitrogênio líquido.

4.8 Atividade da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST)

Estas enzimas foram analisadas em amostras de soro usando Kit (BAYER ADVIA 165, Lerverkusen, Germany) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a atividade da ALT e da AST foi determinada com base na taxa de consumo de NADH avaliada pelo decréscimo do valor de absorbância acompanhada espectrofotometricamente (DU-800, Beckman) a 340 nm. A atividade das enzimas foi expressa em unidades internacionais (U) por litro de soro.

4.9 Perfil Oxidativo

O perfil oxidativo do tecido hepático foi avaliado pelos seguintes parâmetros: 1) determinação de GSH e GSSG; 2) atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR). Todas as análises foram realizadas em espectrofotômetro (DU-800, Beckman) nas condições estabelecidas para cada método.

4.9.1 Determinação de GSH e GSSG

O conteúdo intracelular de glutathiona reduzida (GSH) e de glutathiona oxidada (GSSG) nos tecidos ou do plasma foi determinado de acordo com Titze (1969).

Para determinação do conteúdo de GSH, os tecidos foram triturados em homogeneizador tipo "potter" de alta velocidade durante 2 minutos na proporção de um grama de tecido para 5 mL da solução de ácido 5-sulfosalicílico (5%, m/v) contendo EDTA (5 mmol.L⁻¹) e o plasma homogeneizado em vortex na proporção de 300 µL de amostra para 70 µL da solução de ácido 5-sulfosalicílico (5%, m/v) contendo EDTA (5 mmol.L⁻¹). Ambos foram centrifugados a 10.000 r.p.m. por 5 minutos.

O sobrenadante foi utilizado para determinação da glutathiona total através da reação com o ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB). O meio de reação foi constituído de tampão fosfato de sódio (100 mmol.L⁻¹) contendo EDTA (5 mmol.L⁻¹), DTNB (1,5 mmol.L⁻¹), NADPH (0,2 mmol.L⁻¹) e glutathiona redutase (1 UI) em pH 7,5. A reação foi iniciada pela adição de NADPH e acompanhada a 412 nm por 4 min a 25 °C.

Para determinação do conteúdo de GSSG, foi necessário converter o GSSG em GSH através da homogeneização dos tecidos ou o plasma com a solução de N-etilmaleimida (NEM) (12,5 mmol.L⁻¹) contendo EDTA (5 mmol.L⁻¹) seguido da hidrólise alcalina do NEM. Após centrifugação o sobrenadante foi utilizado para determinação do conteúdo de GSH como descrito acima.

O conteúdo de GSH foi obtido pela subtração do valor de GSSG da glutathiona total.

O estado reduzido/oxidado do conteúdo intracelular dos tecidos obtidos dos camundongos tratados e não tratados foi avaliado pelos conteúdos de GSH e GSSG, baseado na reciclagem com o ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (= DTNB).

Os tecidos foram extraídos em tampão fosfato (60 mmol/L, pH 7,8) e macerados. A solução foi centrifugada a 800 x g durante 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação espectrofotométrica de GSH e GSSG a 412 nm por 3 minutos a 25°C (TIETZE, 1969).

4.9.2 Extração da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationala peroxidase (GPX) e glutationala redutase (GR)

Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato (0,10 mmol/L) e pH 7,5 na proporção de 1:10 para proceder a extração das enzimas. Para tal, os tecidos foram triturados em homogeneizador tipo "potter" de alta velocidade durante 2 minutos na proporção de um grama de fígado para 10 mL de tampão de extração gelado (4,0 °C). Após homogeneização, centrifugaram-se as amostras a 800 x g durante 10 minutos sob refrigeração. O sobrenadante foi retirado, cuidadosamente, com uma pipeta Pasteur, transferido para tubos sob gelo e foi utilizado para determinar a atividade máxima das enzimas antioxidantes.

4.9.3 Atividade máxima da superóxido dismutase (SOD)

A atividade máxima da SOD foi determinada de acordo com a taxa de redução *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) pelo ânion superóxido a 25°C acompanhada por 3 minutos espectrofotometricamente a 550 nm (BEUCHAMP; FRIDOVICH,1971)

e expressa em μmol de NBT consumido por minuto por miligrama de proteína. O sistema xantina-xantina oxidase foi utilizado como fonte de ânion superóxido. A SOD da amostra compete pelo ânion superóxido, inibindo a taxa de redução do NBT. O meio de ensaio continha NBT (0,1 mmol/L), xantina (0,05 mmol/L), EDTA (0,1 mmol/L) e tampão fosfato de sódio (53 mmol/L), pH 7,8). Neste ensaio o primeiro passo foi adequar a quantidade de xantina oxidase necessária para a redução NBT em 0,025 unidades de absorvância por minuto, 1 unidade de atividade de SOD correspondeu a 50% deste valor.

4.9.4 Atividade máxima da catalase (CAT)

A atividade máxima da CAT foi avaliada pelo consumo de peróxido de hidrogênio espectrofotometricamente a 230 nm e 30°C. O meio de ensaio continha Tris-aminometano (50 mmol/L) e EDTA (25 mmol/L) e peróxido de hidrogênio (9,0 mM) (BEERS; SIZER, 1952). A atividade da catalase foi expressa pelo consumo de H_2O_2 por minuto por miligramas de proteína.

4.9.5 Atividade máxima da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade máxima da glutathiona peroxidase foi determinada espectrofotometricamente com base no decréscimo da concentração de NADPH a 340 nm a 37°C (PAGLIA; VALENTINE, 1967) O meio reacional foi constituído de

tampão fosfato (64 mmol/L, pH 7,0), NADPH (0,2 mmol/L), GSH (1 mmol/L), t-butil-hidroperóxido (1 mmol/L) e GR (10 U/mL). A reação foi iniciada pela adição de t-butil-hidroperóxido e a reação acompanhada por 10 min. A atividade da GPx foi expressa pelo consumo de NADPH por minuto por miligramas de proteína.

4.9.6 Atividade máxima da glutathiona redutase (GR)

A atividade máxima da glutathiona redutase foi avaliada através da mensuração da velocidade de oxidação do NADPH com a concomitante redução da glutathiona redutase oxidada (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). O meio de ensaio foi composto de tampão fosfato de potássio 0,2 mol/L pH 7,0 contendo EDTA 2 mmol/L; NADPH 20 mmol/L em Tris-HCl 10 mmol/L pH 7,0; GSSG 20 mmol/L e amostra, a leitura é feita em espectrofotômetro por três minutos a 25 °C. A atividade foi expressa pelo consumo de NADPH por minuto por miligramas de proteína a 340 nm.

4.10 Determinação de proteínas totais

O conteúdo de proteínas dos extratos de células foi determinado espectrofotometricamente pelo método descrito por Bradford (1976), usando soro albumina bovino para construção da curva padrão.

4.11 Fragmentação de DNA

Para a realização do experimento foram utilizadas amostras de fígado dos animais controles e os que receberam AIA 50, 250 e 500 mg/Kg de peso vivo do animal, na ausência e presença de DEN, sacrificados após 4 h e 24 h.

4.11.1 Extração do DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o kit (Wizard® Genomic DNA Purification) seguindo as instruções do fabricante, que consiste: a) maceração do tecido, com o objetivo de aumentar a superfície de contato; b) uso de solução de RNase para romper a membrana celular, e isolar moléculas do restante celular, deixando o DNA no sobrenadante; c) precipitação de proteínas; d) transferência do sobrenadante e solubilização com etanol 70%, resultando ao final uma solução do DNA, diluída em água mili-Q. O DNA presente na solução obtida foi quantificado pelo aparelho BioPhotometer®, sendo utilizado o programa dsDNA (DNA dupla fita). Empregou-se a diluição 1:50 de amostra (1 μ L de amostra + 49 μ L de água) e o resultado obtido foi à concentração de DNA em ng/ μ L. Estabeleceu-se nas análises, a razão A260/280 para as leituras de absorbâncias, que indica um fator de pureza na extração.

4.11.2 Corrida eletroforética em gel de poliacrilamida

O DNA extraído e quantificado foi submetido à eletroforese vertical em gel de poliacrilamina 8% a 100V por aproximadamente 90 minutos e corado com nitrato de prata 0,2%. (BASSAM et al., 1991). Os géis foram escaneados e apresentados como figuras e submetidos ao programa de computador Image-J, que realiza a leitura das bandas de DNA fragmentado em valores numéricos para posterior análise estatística.

4.12 Análises Estatísticas

A comparação entre grupos foi realizada utilizando-se análises de variância (ANOVA), ao nível de significância de 5% de probabilidade. Para as diferenças significativas foram aplicadas comparações de médias usando o teste de Tukey, utilizando-se o software Minitab.

5 RESULTADOS

Inicialmente neste trabalho, procurou-se estabelecer uma dose ideal de ácido indol-3-acético para a administração nos camundongos. Esse procedimento foi estabelecido para que o AIA pudesse ser utilizado em concentrações seguras, sem a possibilidade desta auxina se tornar oxidante, mas com ação suficiente para agir como antioxidante. Nesse sentido, o trabalho foi dividido em duas etapas: 1ª etapa de dose-resposta do AIA e a segunda etapa com indução de um estresse oxidativo causado pelo hepatocarcinógeno DEN.

5.1 Primeira Etapa

Dose Resposta do Ácido Indol-3-Acético

Nessa etapa foram realizadas as pesagens dos animais nos dias 1º, 3º, 6º, 9º e 15º do tratamento. Essa pesagem foi realizada com o intuito de observar uma possível perda ou ganho de peso dos animais em virtude do tratamento com o AIA. Nas Figuras 5 e 6 estão apresentadas as evoluções dos pesos individuais dos animais machos e fêmeas, respectivamente, em cada grupo de estudo, nos cinco dias de pesagem. Observou-se que o tratamento com AIA nas diferentes doses não alterou o ganho de peso dos animais, em relação aos controles, igualmente para os machos e fêmeas.

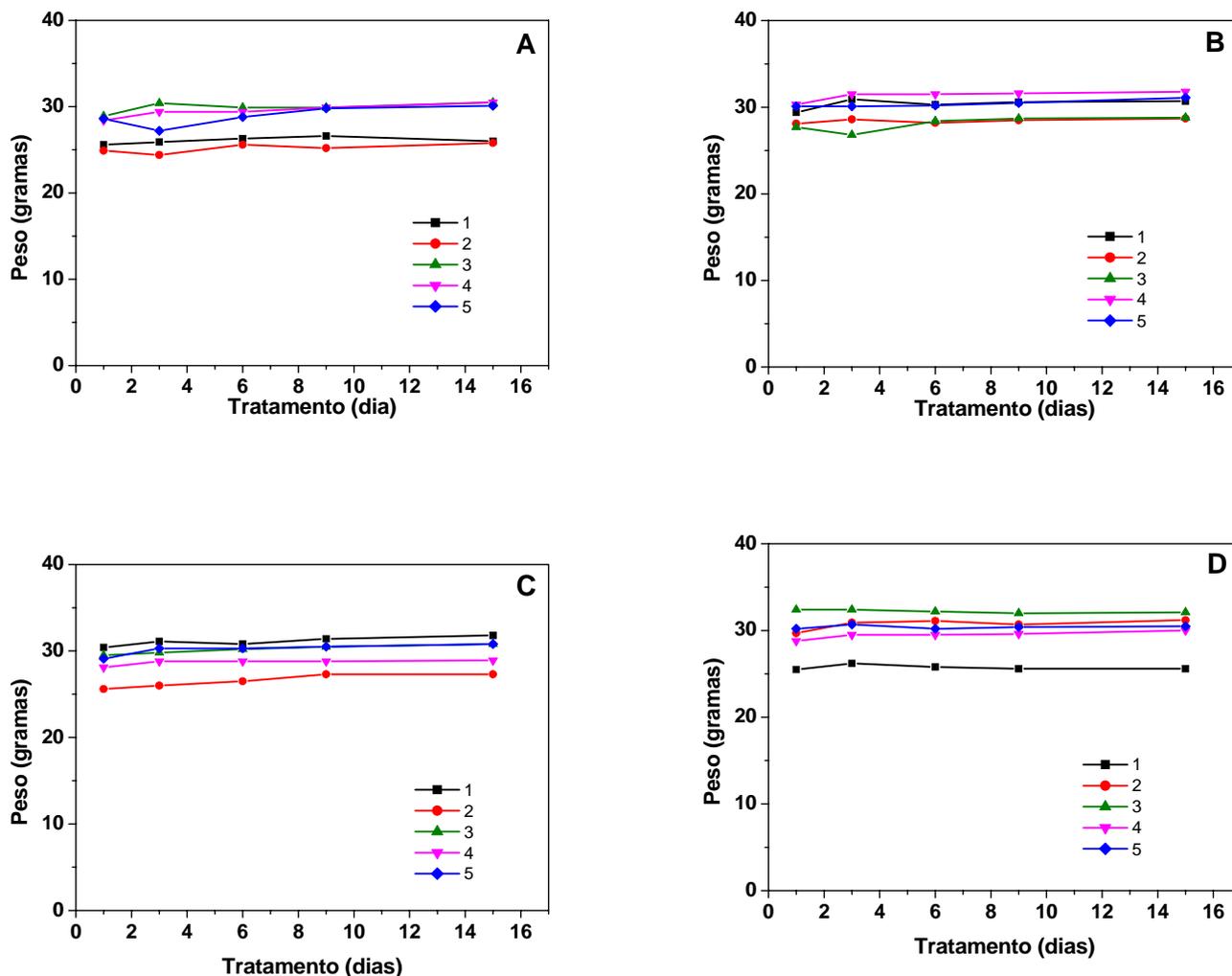


Figura 5. Evolução individual do peso dos cinco camundongos macho de cada grupo, controle e nas três doses de AIA, durante o período de tratamento. Os cinco animais foram identificados pelos números 1, 2, 3, 4 e 5 em todos os grupos: **(A)**- animais controles; **(B)**- animais tratados com AIA na dose de 100 mg/Kg de peso vivo; **(C)**- animais tratados com AIA na dose de 200 mg/Kg de peso vivo; **(D)**- animais tratados com AIA na dose de 500 mg/Kg de peso vivo.

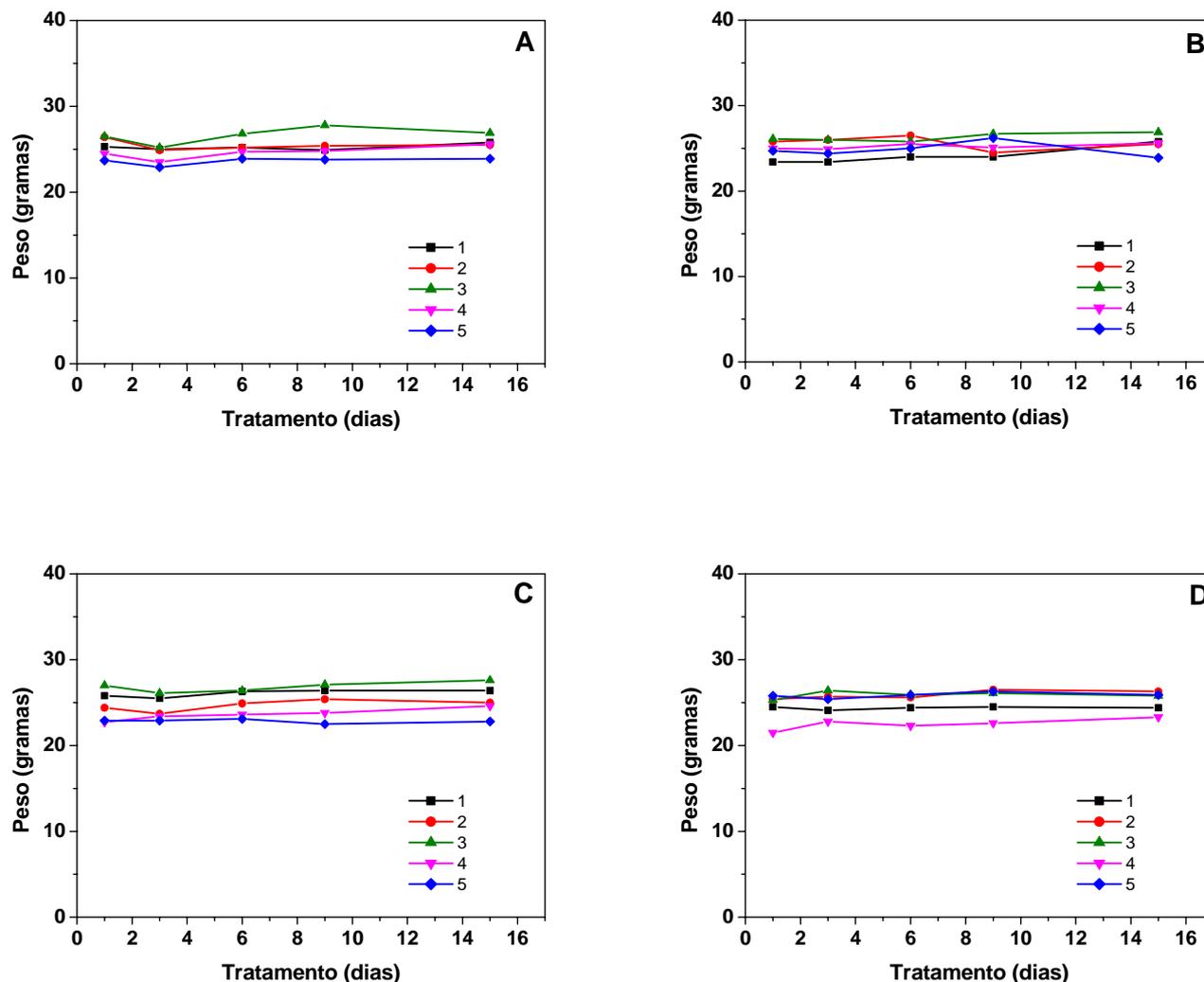


Figura 6. Evolução individual do peso dos cinco camundongos fêmea de cada grupo, controle e nas três doses de AIA. Os cinco animais foram identificados pelos números 1, 2, 3, 4 e 5 em todos os grupos: **(A)**- animais controles; **(B)**- animais tratados com AIA na dose de 100 mg/Kg de peso vivo; **(C)**- animais tratados com AIA na dose de 200 mg/Kg de peso vivo; **(D)**- animais tratados com AIA na dose de 500 mg/Kg de peso vivo.

Para avaliar a possível hepatotoxicidade do AIA foi realizada a pesagem dos fígados de todos os animais logo após o sacrifício dos mesmos. Nas Tabelas 2 e 3, estão apresentados os valores relativos entre o peso do fígado o peso vivo, denominados de porcentagem relativa do fígado, dos camundongos macho e fêmeas respectivamente.

Tabela 2. Avaliação individual (1, 2, 3, 4 e 5) dos pesos dos fígados dos camundongos macho, controles e tratados com três doses de AIA (100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 500 mg/Kg de peso vivo), do peso vivo destes animais pesados no 16^o dia (antes do sacrifício) e a porcentagem relativa do fígado expressa como Fígado/PV(%) e determinada através da relação do peso do órgão e o peso vivo do animal.

Machos	Repetição	Fígado(g)	Peso Vivo(g)	Fígado/PV(%)
Controle	1	1,3261	26,0	5,10%
	2	1,2075	25,8	4,68%
	3	1,4360	30,5	4,71%
	4	1,5345	30,5	5,03%
	5	1,3698	31,1	4,55%
100mg/Kg	1	1,6281	30,7	5,30%
	2	1,4411	28,7	5,02%
	3	1,3862	28,8	4,81%
	4	1,5440	31,8	4,86%
	5	1,5463	31,1	4,97%
200mg/Kg	1	1,6544	31,8	5,20%
	2	1,3740	27,3	5,03%
	3	1,4295	30,8	4,64%
	4	1,3284	28,9	4,60%
	5	1,4777	30,8	4,80%
500mg/Kg	1	1,4688	25,6	5,74%
	2	1,5282	31,2	4,90%
	3	1,7117	32,1	5,33%
	4	1,4828	30,0	4,94%
	5	1,5978	30,5	5,24%

Tabela 3. Avaliação individual (1, 2, 3, 4 e 5) dos pesos dos fígados dos camundongos fêmea, controles e tratados com três doses de AIA (100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 500 mg/Kg de peso vivo), do peso vivo destes animais e porcentagem relativa do fígado expressa como Fígado/PV(%) e calculada pela relação do peso do órgão e o peso vivo do animal.

Fêmeas	Repetição	Fígado(g)	Peso Vivo(g)/16º dia	Fígado/PV(%)
Controle	1	1,2610	25,8	4,89%
	2	1,1785	25,5	4,62%
	3	1,3238	26,9	4,92%
	4	1,1427	25,6	4,46%
	5	1,1162	23,9	4,67%
100mg/Kg	1	1,3373	25,8	5,18%
	2	1,2024	25,5	4,72%
	3	1,1978	26,9	4,45%
	4	1,1584	25,6	4,53%
	5	1,3176	23,9	5,51%
200mg/Kg	1	1,3778	26,4	5,22%
	2	1,2153	25,0	4,86%
	3	1,3253	27,6	4,80%
	4	1,1046	24,6	4,49%
	5	1,0727	22,8	4,70%
500mg/Kg	1	1,2026	24,4	4,93%
	2	1,3692	26,3	5,21%
	3	1,3505	25,8	5,23%
	4	1,2164	23,3	5,22%
	5	1,2316	25,9	4,76%

Os valores médios da porcentagem relativa do fígado dos camundongos machos e fêmeas controles e dos tratados com AIA estão apresentados na Figura 7.

Com base nos dados apresentados nas Tabelas 2 e 3 e na Figura 7, observa-se que não houve alterações nem nos pesos dos fígados, nem na porcentagem relativa do fígado dos animais tratados com AIA em relação aos controles. Estes resultados sugerem que o tratamento com AIA não induz efeito hepatotóxico, nem

quanto à dose desta auxina e nem quanto ao sexo dos animais avaliados individualmente ou em grupo.

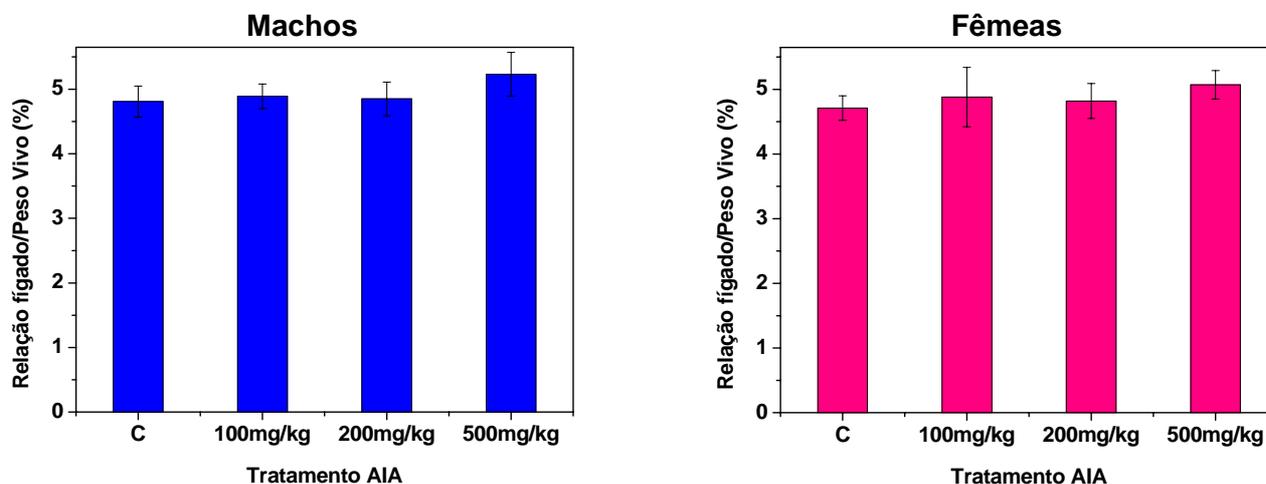


Figura 7. Gráficos com os valores das médias das porcentagens relativas dos fígados dos animais calculadas pela relação entre o peso do fígado e o peso vivo para os machos e as fêmeas, controle (C) e nas três doses de AIA (100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 500 mg/Kg de peso vivo). Os resultados estão expressos como a média e desvio padrão para cinco animais por grupo.

Com administração de ácido indol-3-acético via intragástrica em três diferentes doses, não foi possível observar alteração do nível de alanina aminotransferase avaliada pela atividade desta enzima tanto para os camundongos machos e quanto para as fêmeas em relação aos respectivos controles (Tabela 4). Estes resultados corroboram com a proposta de não hepatotoxicidade do AIA, uma vez que a atividade da enzima ALT sanguínea atua como marcadora de distúrbios metabólicos hepáticos.

Tabela 4. Efeito do AIA sobre a atividade da alanina aminotransferase (ALT) avaliada no soro de camundongos macho e fêmeas controles (C) e tratados com AIA nas doses de 100, 200 e 500 mg/Kg de peso vivo do animal.

Sexo	<i>Tratamento com AIA em mg/kg de peso vivo</i>			
	C	100mg/Kg	200mg/Kg	500mg/Kg
Machos	60,5 (6,9)	58,9 (7,0)	59,0 (7,0)	58,9 (6,9)
Fêmeas	59,7 (7,9)	58,0 (7,3)	58,7 (7,4)	59,0 (6,9)

Os resultados estão expressos como a média e desvio padrão para 5 animais por grupo e experimentos realizados em triplicata. A atividade da ALT está expressa em U.L⁻¹.

Na Tabela 5 encontram-se os resultados da atividade das enzimas antioxidantes hepáticas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR). Observa-se que o AIA atuou diminuindo a atividade da SOD em 13% e 33% para os tratamentos 100 mg/Kg e 200 mg/Kg, respectivamente, em relação ao controle; e também atuou na redução da atividade da CAT em 14% e 18% para os tratamentos 200 mg/Kg e 500 mg/Kg, em relação ao controle. Porém, nenhuma alteração foi detectada na atividade da glutaciona redutase no fígado dos camundongos macho tratados com AIA nas três doses em relação aos controles. Para as fêmeas submetidas às três doses de AIA não houve nenhuma alteração na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GR, em relação ao controle.

A redução da atividade de algumas enzimas antioxidantes, pode estar relacionada com um possível efeito antioxidante do AIA neste órgão, porém, o principal objetivo desta etapa é adequar uma dose ideal do AIA para que o composto

se mostre ativo como antioxidante sem ser tóxico ao animal. Por isso, não se pode afirmar a ação antioxidante do composto sem que os animais tenham sido desafiados por um agente oxidativo efetivo.

Tabela 5. Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) avaliadas em fígado de camundongos macho e fêmeas tratados com AIA nas doses de 100, 200 e 500 mg/Kg de peso vivo do animal.

Enzimas	<i>Tratamento com AIA em mg/kg de peso vivo</i>			
	C	100mg/Kg	200mg/Kg	500mg/Kg
Machos				
SOD	79,9 (21,1)	69,2 (16,4)*	53,5 (11,1)*	89,7 (19,0)
CAT	251,5 (24,4)	239,2 (12,0)	215,8 (31,9)*	205,1 (9,1)*
GPx	1,40 (0,10)	1,20 (0,20)	1,20 (0,20)	1,30 (0,10)
GR	92,5 (8,3)	76,3 (8,3)	68,8 (6,9)	91,8 (11,8)
Fêmeas				
SOD	59,7 (10,9)	44,9 (9,4)	49,9 (33,5)	76,1 (26,4)
CAT	157,4 (19,7)	188,3 (33,3)	187,2 (38,4)	154,5 (28,0)
GPx	1,70 (0,30)	1,50 (0,30)	1,70 (0,20)	1,50 (0,20)
GR	73,2 (4,8)	70,2 (7,5)	67,0 (18,7)	69,7 (15,8)

*p < 0,05 em relação ao controle. Os resultados estão expressos como a média e desvio padrão para 5 animais por grupo e experimentos realizados em triplicata. A atividade da SOD, CAT e GPx está expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{miligrama de proteína})^{-1}$ e GR expressa em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{miligrama de proteína})^{-1}$

Foi necessário avaliar também o perfil oxidativo do fígado e, para isso, foram determinados os níveis de GSH e GSSG.

Nesse trabalho não houve alteração do conteúdo de GSH e GSSG no fígado dos camundongos macho ou fêmea (Tabela 6). Estes resultados sugerem que o tratamento com AIA não alterou o perfil oxidativo do fígado dos animais.

Tabela 6. Efeito do AIA sobre o nível de glutathiona reduzida (GSH; mmol/g de tecido úmido), glutathiona oxidada (GSSG; mmol/g de tecido úmido) avaliado em fígado de camundongos macho e fêmeas controles (C) e tratados com AIA nas doses de 100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 500 mg/Kg de peso vivo do animal.

	<i>Tratamento com AIA em mg/kg de peso vivo</i>			
	C	100mg/Kg	200mg/Kg	500mg/Kg
Machos				
GSH	4,8 (0,7)	5,1 (1,0)	4,9 (0,3)	5,8 (1,3)
GSSG	0,13 (0,07)	0,16 (0,06)	0,23 (0,05)	0,18 (0,08)
Fêmeas				
GSH	5,2 (0,7)	6,0 (0,4)	4,9 (0,5)	5,0 (0,7)
GSSG	0,17 (0,08)	0,16 (0,03)	0,24 (0,03)	0,18 (0,03)

Os resultados estão expressos como a média e desvio padrão para 5 animais por grupo e experimentos realizados em triplicata.

5.2 Segunda Etapa

Avaliação do efeito da administração de AIA sobre a prevenção de hepatocarcinogênese induzida por DEN

Nesta etapa do estudo empregaram-se apenas camundongos macho que foram pesados semanalmente (resultados não apresentados) com a finalidade de adequação das doses de AIA para cada animal em relação ao seu peso.

Na Tabela 7 estão os resultados individuais de peso vivo, peso do fígado e a porcentagem relativa do fígado dos animais controles e tratados com três doses diferentes de AIA determinados no dia do sacrifício. Semelhantemente, foram apresentados, respectivamente na Tabela 8 e Tabela 9, os resultados em que os animais controles e tratados com AIA foram submetidos por 4 horas ou por 24 horas ao DEN, um indutor de hepatocarcinogênese.

Tabela 7. Avaliação individual (1, 2, 3 e 4) do peso vivo dos animais no 16^o dia, do peso do fígado e da porcentagem relativa do fígado (Fígado/PV(%), determinada pela relação do peso do fígado e peso vivo) dos animais controles (C) e tratados com AIA nas diferentes doses (50 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg de peso vivo).

	Repetição	Peso Vivo(g)	Fígado (g)	Fígado/PV(%)
Controle	1	31,2	1,561	5,00%
	2	27,9	1,387	4,97%
	3	28,2	1,326	4,70%
	4	25,4	1,178	4,64%
50mg/Kg	1	31,1	1,561	5,02%
	2	32,7	1,457	4,46%
	3	32,8	1,527	4,66%
	4	28,0	1,392	4,97%
250mg/Kg	1	31,4	1,515	4,82%
	2	28,6	1,341	4,69%
	3	32,0	1,457	4,55%
	4	30,4	1,407	4,63%
500mg/Kg	1	30,1	1,391	4,62%
	2	32,1	1,583	4,93%
	3	32,0	1,519	4,75%
	4	---	---	---

Tabela 8. Avaliação individual (1, 2, 3 e 4) do peso vivo dos animais no 16^o dia, do peso do fígado e da porcentagem relativa do fígado (Fígado/PV(%), determinada pela relação do peso do fígado e peso vivo) dos animais controles (C), dos animais submetidos ao DEN por 4 horas (DEN-4h) e dos animais que foram submetidos ao DEN por 4 horas subsequentemente ao tratamento com AIA nas doses de 50 (50 mg/Kg-DEN 4h), 250 (250 mg/Kg-DEN 4h) e 500 (500 mg/Kg-DEN 4h) miligramas de AIA por quilograma de peso vivo.

Tratamento	Repetição	Peso Vivo(g)	Fígado (g)	Fígado/PV(%)
Controle	1	31,2	1,561	5,00%
	2	27,9	1,387	4,97%
	3	28,2	1,326	4,70%
	4	25,4	1,178	4,64%
DEN 4h	1	30,2	1,461	4,84%
	2	32,9	1,652	5,02%
	3	30,3	1,335	4,41%
	4	26,5	1,265	4,77%
50mg/Kg-DEN 4h	1	29,4	1,396	4,75%
	2	30,6	1,460	4,77%
	3	30,7	1,423	4,64%
	4	32,3	1,608	4,98%
250mg/Kg-DEN 4h	1	31,3	1,516	4,84%
	2	32,1	1,608	5,01%
	3	30,6	1,550	5,07%
	4	29,6	1,582	5,34%
500mg/Kg-DEN 4h	1	27,2	1,308	4,81%
	2	25,6	1,283	5,01%
	3	26,3	1,412	5,37%
	4	26,3	1,365	5,19%

Tabela 9. Avaliação individual (1, 2, 3 e 4) do peso vivo dos animais no 16^o dia, do peso do fígado e da porcentagem relativa do fígado (Fígado/PV(%), determinada pela relação do peso do fígado e peso vivo) dos animais controles (C), dos animais submetidos ao DEN por 24 horas (DEN-24h) e dos animais que foram submetidos ao DEN por 24 horas (DEN-4h) subseqüentemente ao tratamento com AIA nas doses de 50 (50mg/Kg-DEN 24h), 250 (250mg/Kg-DEN 24h) e 500 (500 mg/Kg-DEN 24h) miligramas de AIA por quilograma de peso vivo.

Tratamento	Repetição	Peso Vivo(g)	Fígado (g)	Fígado/PV(%)
Controle	1	31,2	1,561	5,00%
	2	27,9	1,387	4,97%
	3	28,2	1,326	4,70%
	4	25,4	1,178	4,64%
DEN 24h	1	25,6	1,230	4,80%
	2	27,4	1,209	4,41%
	3	24,8	1,213	4,89%
	4	26,9	1,143	4,25%
50mg/Kg-DEN 24h	1	25,9	1,229	4,75%
	2	23,5	1,146	4,88%
	3	25,7	1,322	5,14%
	4	22,4	1,286	5,74%
250mg/Kg-DEN 24h	1	24,9	1,186	4,76%
	2	26,5	1,352	5,10%
	3	24,6	1,215	4,94%
	4	25,1	1,189	4,74%
500mg/Kg-DEN 24h	1	28,4	1,340	4,72%
	2	29,4	1,405	4,78%
	3	26,5	1,294	4,88%
	4	29,6	1,34	4,53%

Foi possível observar que a indução de hepatocarcinogênese e o tratamento com AIA em conjunto com exposição ao DEN, não alterou o peso vivo e nem a relação fígado e peso vivo dos animais. Para uma maior elucidação desses resultados, as médias dos valores da porcentagem relativa do fígado estão apresentadas na Figura 7.

Os resultados da Tabela 10 apresentam a atividade de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) avaliada no soro dos animais controles e tratados com AIA em três doses. Esses resultados demonstram que o AIA não apresentou hepatotoxicidade, uma vez que não houve alteração na atividade das enzimas ALT e AST nos animais tratados com AIA em relação aos controles, em nenhuma das doses administradas.

O DEN causou aumento de 2,5 vezes e de 80% no valor da atividade das enzimas ALT e AST, respectivamente, somente após 24 horas, em relação ao grupo controle. Nenhuma alteração significativa foi detectada na atividade da ALT e AST do soro dos animais submetidos por 4 horas ao efeito do DEN, em relação aos controles. Com isso, é possível observar que o hepatocarcinógeno escolhido instalou seu estresse detectável por estas enzimas, 24 horas após a sua inoculação.

A administração de AIA não preveniu os efeitos nocivos causados pelo DEN sobre a atividade de ALT e AST após 24 horas da administração do referido hepatocarcinógeno; visto não haver diferença significativa entre os valores das atividades destas enzimas dos animais tratados com AIA e subsequentemente submetidos ao DEN por 24 horas e àqueles valores de atividade de ALT e AST dos animais que receberam apenas DEN por 24 horas.

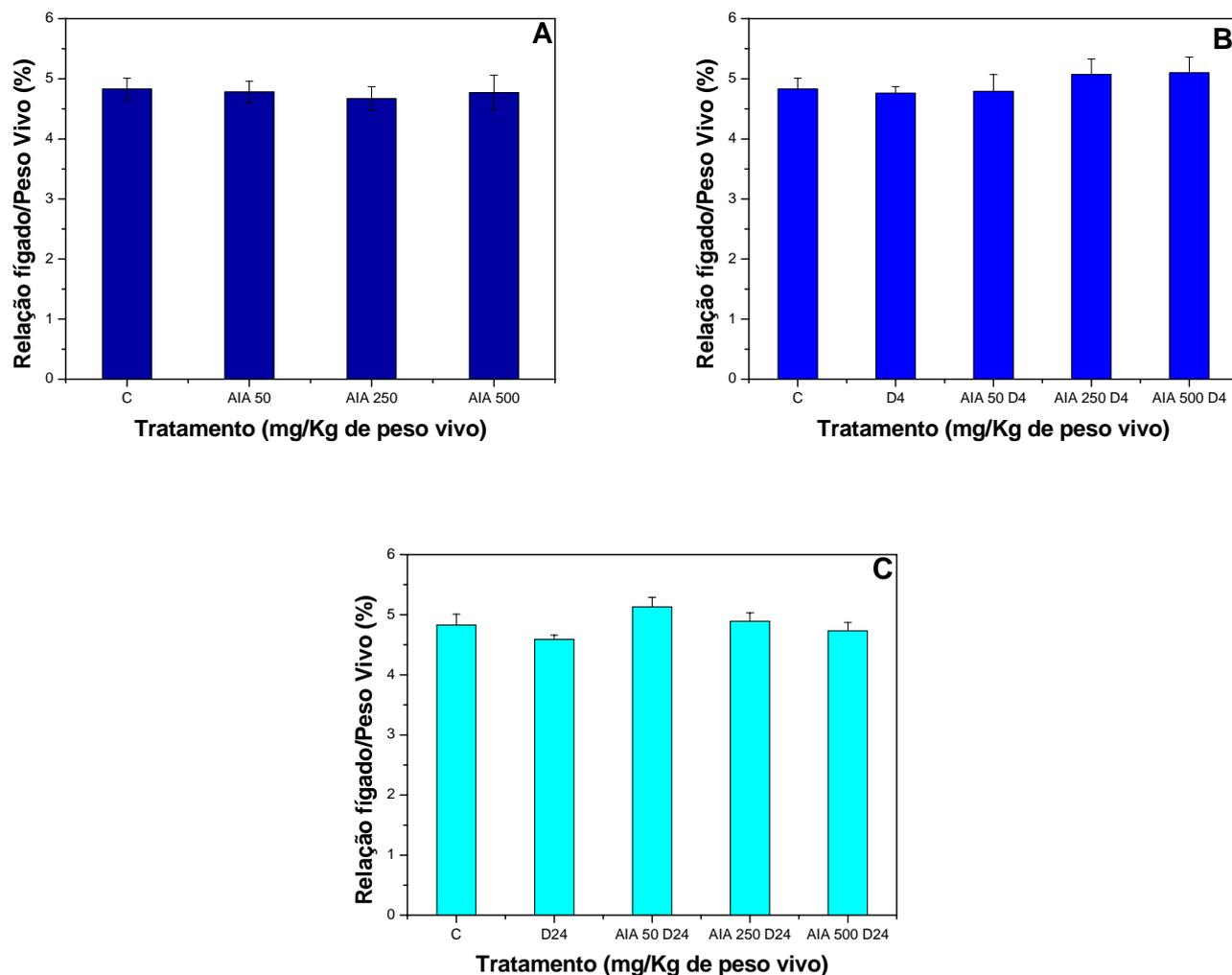


Figura 8: Gráficos com os valores das médias das porcentagens relativas dos fígados dos animais calculadas pela relação entre o peso do fígado e o peso vivo para machos. **(A)**- controle (C) e as três doses de AIA (100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 500 mg/Kg de peso vivo). **(B)**- Controle (C), exposição ao DEN 4 horas (D4), e as três doses de AIA associadas à exposição ao DEN 4 horas (100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 500 mg/Kg de peso vivo); **(C)**- Controle (C), exposição ao DEN 24 horas (D24), e as três doses de AIA associado à exposição ao DEN 24 horas (100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 500 mg/Kg de peso vivo). Os resultados estão expressos como a média e desvio padrão para quatro animais por grupo.

Tabela 10. Valores de atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) avaliada no soro de camundongos macho controles (C) e tratados com AIA por via intragástrica nas doses de 50, 250 e 500 mg/Kg de AIA por quilograma de peso vivo, na ausência e presença de DEN por 4 horas (DEN-4h) e 24 horas (DEN-24h).

	<i>Tratamento com AIA em mg/kg de peso vivo</i>											
	Ausência de DEN				Presença de DEN-4h				Presença de DEN-24h			
	C	50	250	500	C	50	250	500	C	50	250	500
ALT	59(3)	51(6)	52(2)	58(10)	65(16)	55(3)	58(12)	50(1)	205(66)*	263(56)*	153(83)*	216(47)*
AST	109(42)	83(10)	90(9)	86(12)	104(18)	86(10)	91(22)	111(11)	135(45)*	173(48)*	189(45)*	176(45)*

*p < 0,05 em relação ao controle. Os resultados estão expressos como a média e desvio padrão para 4 animais por grupo e experimentos realizados em triplicata. A atividade da ALT e AST está expressa em U.L⁻¹.

Os resultados da atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase e do substrato GSH, Avaliados em animais controles e tratados com AIA na ausência e presença de DEN foram apresentados na Tabela 11.

A administração de AIA não alterou a atividade da SOD, CAT, GPx e GR avaliada pela comparação entre as atividades destas enzimas nos fígados dos animais tratados com AIA e as dos controles.

O DEN provocou diminuição na atividade das enzimas CAT e GR em 30% e 23%, respectivamente, após 4 horas de sua administração em relação aos animais controles, ou seja, sem a administração do DEN, indicando estresse oxidativo instalado nesse tempo. As enzimas SOD e GPx não sofreram alterações significativas em suas atividades após 4 horas da ação do hepatocarcinógeno, em relação ao controle.

O tratamento com o AIA em três doses mostrou ação protetora dos efeitos nocivos causados pelo DEN após 4 horas de exposição sobre as enzimas catalase e glutathione reductase hepáticas, visto que as atividades destas enzimas nos fígados dos animais tratados com AIA e posteriormente submetidos ao DEN por 4 horas, não apresentaram diferença significativa em relação aos animais controles.

Por outro lado, o DEN não provocou nenhum efeito nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GR quando avaliadas após 24 horas de sua administração. Estes resultados sugerem que após 24 horas de exposição ao DEN ocorreu uma adaptação do organismo ao estresse oxidativo induzido pelo hepatocarcinógeno, possivelmente, no sentido de aumentar a expressão gênica da CAT e GR que foram as enzimas sensíveis ao efeito do DEN.

A administração de AIA nas diferentes doses não alterou o conteúdo de GSH hepático, avaliada em relação aos animais controles, sugerindo que o AIA não alterou o perfil oxidativo hepático. Mas, no entanto, nas condições de estudo, o DEN não demonstrou suas propriedades oxidantes, uma vez que não diminuiu os níveis de GSH em nenhum dos tempos de exposição ao referido carcinógeno em relação aos animais controles.

O DEN não alterou os níveis nem de GSH e nem de GSSG no conteúdo hepático, contrariando a significativa redução de atividade da glutathion redutase, após 4 horas de exposição dos animais a este carcinógeno, uma vez que esta enzima atua na reposição de GSH no meio celular a partir de GSSG. A administração concomitante de AIA e DEN não alteraram o conteúdo de GSH e de GSSG nem quando comparados aos níveis basais dos animais controles e nem quando comparados aos animais expostos apenas ao DEN.

Com o intuito de elucidar a ação não tóxica, ou não oxidante, do AIA em todas as doses utilizadas neste estudo, foi elaborada uma curva dose-resposta do AIA sobre a atividade das enzimas antioxidantes (Figura 9). Nesta Figura estão os resultados referentes ao efeito da administração intragástrica de AIA sobre a atividade das enzimas SOD, CAT, GPx e GR incluindo todas as doses de AIA elaborada pelo agrupamento dos dados da 1ª etapa com os dados da 2ª etapa dos estudos, sendo neste último apenas os controles, ou seja, sem a exposição dos animais ao hepatocarcinógeno. As curvas dose-resposta ilustram as inalteradas atividades destas enzimas antioxidantes frente à administração de AIA nas quantias que variaram de 50 a 500 miligramas por quilograma de peso vivo do animal.

Tabela 11. Atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR) avaliada em fígado de camundongos controles (C) e tratados com AIA nas doses de 50, 250 e 500 mg/Kg de peso vivo, na ausência e na presença de DEN por 4 horas (DEN-4h) e 24 horas (DEN-24h).

<i>Tratamento com AIA em mg/kg de peso vivo do animal</i>												
Enzimas	Ausência de DEN				Presença de DEN-4h				Presença de DEN-24h			
	C	50	250	500	C	50	250	500	C	50	250	500
SOD	80(24)	72(13)	68(15)	96(23)	91(25)	66(9)	76(15)	78(14)	85(11)	58(10)	77(29)	63(17)
CAT	207(62)	240(49)	225(52)	206(10)	144(35)*	174(30)	223(27)	229(53)	229(26)	195(9)	223(27)	191(14)
GR	77(19)	87(10)	86(19)	92(10)	59(13)*	82(9)	100(17)	101(13)	90(16)	86(19)	99(11)	87(10)
GPx	1,5(0,3)	1,9(0,1)	1,8(0,3)	1,6(0,3)	2,0(0,3)	1,4(0,1)	1,9(0,2)	2,2(0,1)	1,7(0,3)	1,8(0,3)	1,9(0,4)	1,5(0,3)
GSH	5,7(1,7)	7,0(0,9)	7,2(1,6)	5,8(1,2)	7,5(0,9)	5,9(0,9)	7,0(0,9)	7,8(1,4)	8,3(1,5)	6,7(0,9)	9,2(1,9)	8,0(1,2)

*p < 0,05 em relação ao controle. Os resultados estão expressos como a média e desvio padrão para 4 animais por grupo e experimentos realizados em triplicata. A atividade da SOD, CAT e GPx está expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{miligrama de proteína})^{-1}$ e GR expressa em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{miligrama de proteína})^{-1}$

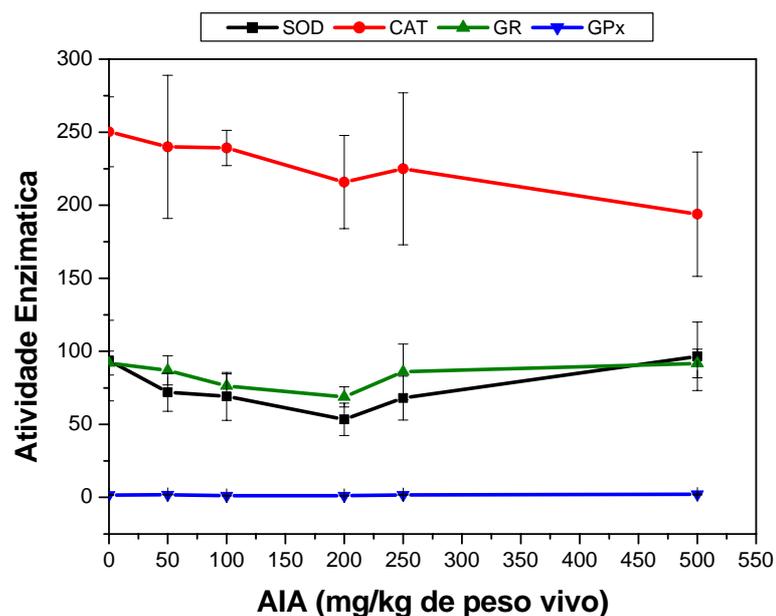


Figura 9. Curva dose-resposta de AIA sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxidos dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR). Os valores estão expressos como média e desvio padrão. Os resultados de SOD e CAT estão expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg de proteína})^{-1}$ e GR expressos em $\text{nmol min}^{-1}\cdot(\text{mg de proteína})^{-1}$. Os resultados da atividade da GPx estão multiplicados por dez e expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}(\text{mg de proteína})^{-1}$.

5.3 Fragmentação de DNA

Na Tabela 12 estão os resultados referentes à quantificação de DNA espectrofotometricamente avaliadas nos fígados dos animais controles e tratados com AIA na ausência e presença de DEN.

Com relação à concentração de DNA, todas as amostras ficaram na faixa permitida que é de 1,8 a 2,0, (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Esses valores são provenientes da razão entre A_{260}/A_{280} , que são as absorbâncias utilizadas para quantificar DNA (comprimento de onda = 260 nm) e proteínas (comprimento de onda = 280 nm). Quando o resultado da amostra estiver dentro da faixa ideal, indica extração adequada, sem contaminação por proteína ou por produtos de extração.

Na Figura 10 estão os resultados da fragmentação de DNA avaliados em gel de poliacrilamida. É possível observar-se que não ocorreu fragmentação de DNA hepático dos animais controles ou tratados com AIA em todas as doses administradas em relação ao padrão de corrida que contém fragmentos de DNA que variam de 100 em 100 até 1000 pares de bases. Esses resultados sugerem que o AIA não apresentou efeito tóxico para o animal em termos de fragmentação de DNA.

Tabela 12. Quantificação de DNA espectrofotometricamente dada pela absorbância em 260 nm (A260 nm) e 280 nm (A280 nm), razão das absorbâncias em 260 nm e 280 nm (A260/280), concentração de DNA (ng/ μ L) na amostra em fígados de animais controles (0) e tratados com ácido indol-3-acético (AIA) nas doses de 50, 250 e 500 miligramas por quilograma de peso vivo na ausência e presença de dietilnitrosamina (DEN) por 4 horas e 24 horas.

DEN	AIA (mg/Kg)	A260 nm	A280 nm	A260/280	Concentração ng/ μ L
Ausência	0	0,131	0,081	1,75	293
	50	0,158	0,107	1,71	306
	250	0,190	0,135	1,67	339
	500	0,102	0,690	1,67	201
Presença 4h	0	0,155	0,105	1,67	308
	50	0,110	0,074	1,71	221
	250	0,197	0,135	1,72	374
	500	0,177	0,126	1,67	321
Presença 24h	0	0,321	0,266	1,72	570
	50	0,280	0,204	1,71	462
	250	0,162	0,114	1,69	294
	500	0,311	0,233	1,67	486

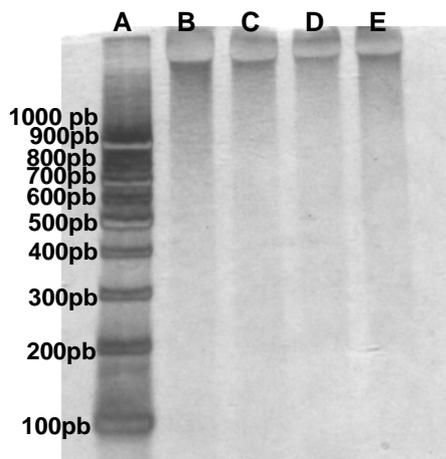


Figura 10. Fragmentação de DNA: **(A)**- padrão de DNA de 100 a 1000 pares de bases (pb); **(B)**- animal controle tratado com PBS; **(C)**- Animal tratado com AIA 50 mg/Kg de peso vivo; **(D)**- animal tratado com AIA 250 mg/Kg de peso vivo e **(E)**- animal tratado com AIA 500 mg/Kg de peso vivo. Os resultados representados pelas letras C, D e E caracterizam apenas um animal do referido grupo de estudo. Os resultados são ilustrativos de três repetições (n=3) em que todas apresentaram as mesmas características.

Com a Figura 11 pode-se observar que o indutor de hepatocarcinogênese, o DEN, promoveu fragmentação de DNA hepático, apenas após 24 horas de exposição do animal a este composto, comparado ao padrão de DNA fragmentado nas proximidades das bandas 210, 410 e 610 pares de bases. Porém, nenhum efeito na fragmentação de DNA hepático foi observado após 4 horas de exposição do animal ao DEN.

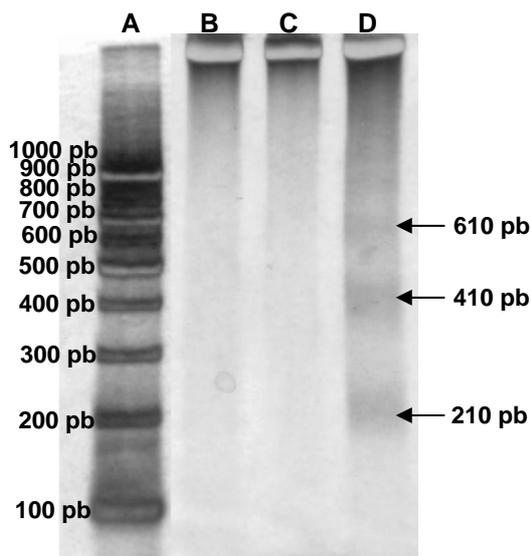


Figura 11. Efeito do DEN sobre a fragmentação de DNA: **(A)**- padrão de DNA de 100 a 1000 pares de bases (pb); **(B)**- animal controle tratado com PBS; **(C)**- animal submetido ao DEN e sacrificado após 4 horas; **(D)**- animal submetido ao DEN e sacrificado após 24 horas. As setas indicam o aparecimento de DNA fragmentado em 210, 410 e 610 pares de bases. Os resultados representados pelas letras C, D e E caracterizam apenas um animal do referido grupo de estudo. Os resultados são ilustrativos de três repetições (n=3) em que todas apresentaram as mesmas características.

Ainda com relação à fragmentação de DNA, foi realizada uma corrida de eletroforese agrupando no mesmo gel de poliacrilamida os animais tratados com AIA nas diferentes doses, os animais que receberam DEN por 24 horas sem tratamento com AIA e os animais tratados com AIA nas diferentes doses e subsequentemente submetidos ao DEN por 24 horas (Figura 12). O procedimento em questão foi realizado no intuito de demonstrar o efeito do AIA sobre a reversão dos efeitos nocivos do DEN sobre a fragmentação de DNA hepático.

Com base nos resultados apresentados na Figura 12 é possível visualizar o efeito parcialmente protetor do AIA sobre a fragmentação de DNA induzida pelo DEN, uma vez que o DNA das células dos animais tratados com AIA apresentou menor quantidade de fragmentos de DNA caracterizados em 210, 410 e 610 pares de bases. Qualitativamente, a redução da quantidade de DNA é proposta pela diminuição na intensidade de cor da banda, que é a região onde o fragmento de DNA corado pela prata se encontra.

A fragmentação do DNA hepático dos animais submetidos aos efeitos do DEN foi quantificada utilizando o programa de computador Image-J para três géis de poliacrilamida, similares ao exposto qualitativamente na Figura 12, e os resultados estão na Figura 13.

Os fragmentos de DNA causados pela exposição dos animais ao DEN por 24 horas, foram caracterizados em três tamanhos diferentes, sendo estes em 210, 410 e 610 pares de bases. As concentrações dos fragmentos avaliadas pelas densidades de “pixels” apresentaram características semelhantes aos fragmentos padrões, ou seja, maior concentração de fragmentos em 400 pares de bases, seguidos dos de 200 pares de bases e por último os fragmentos de 600 pares de bases.

Os fígados dos animais tratados com AIA nas doses de 50, 250 e 500 miligramas por quilograma de peso vivo do animal e expostos ao DEN por 24 horas apresentaram fragmentos característicos ao efeito deste hepatocarcinógeno sobre o DNA; porém, a administração de AIA nas respectivas doses (50, 250 e 500 mg/Kg), reduziu a fragmentação de DNA em 42%, 51% e 48% para os fragmentos de 210 pares de bases, em 54%, 56% e 55% os fragmentos de 410 pares de bases e em 51%, 57% e 53% os fragmentos de 610 pares de bases, em comparação aos

respectivos valores da fragmentação de DNA hepático dos animais expostos somente ao DEN por 24 horas. Não houve diferença significativa entre as diferentes doses utilizadas de AIA quanto aos efeitos protetores do DNA dos animais expostos ao DEN.

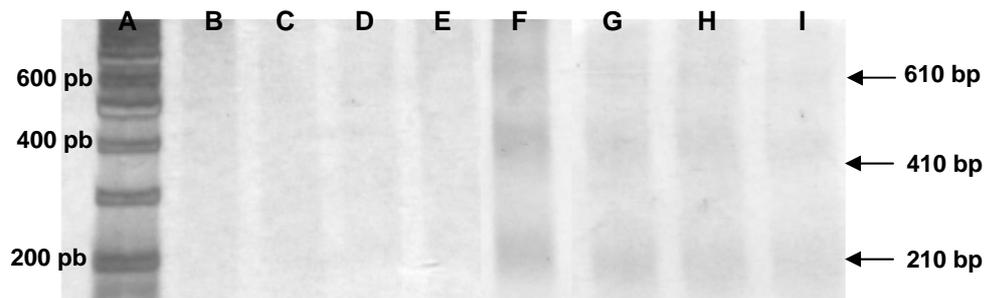


Figura 12. Ação do AIA sobre o efeito do DEN na fragmentação de DNA expressa na região de 200 a 600 pares de bases (pb): **(A)**- padrão de DNA de 100 a 1000 pb ; **(B)**- animal controle tratado com PBS; **(C)**- animal tratado com AIA 50 mg/Kg de peso vivo; **(D)**- animal tratado com AIA 250mg/Kg de peso vivo, **(E)**- animal tratado com AIA 500 mg/kg de peso vivo; **(F)**- animal exposto ao DEN por 24 horas; **(G)**- animal tratado com AIA 50 mg/Kg de peso vivo e expostos ao DEN por 24 horas; **(H)**- animal tratado com AIA 250 mg/Kg de peso vivo e expostos ao DEN por 24 horas, **(I)**- animal tratado com AIA 500 mg/Kg de peso vivo e expostos ao DEN por 24 horas. As setas indicam o aparecimento de DNA fragmentado em 210, 410 e 610 pares de bases. Os resultados representados pelas letras C, D e E caracterizam apenas um animal do referido grupo de estudo. Os resultados são ilustrativos de três repetições (n=3) em que todas apresentaram as mesmas características.

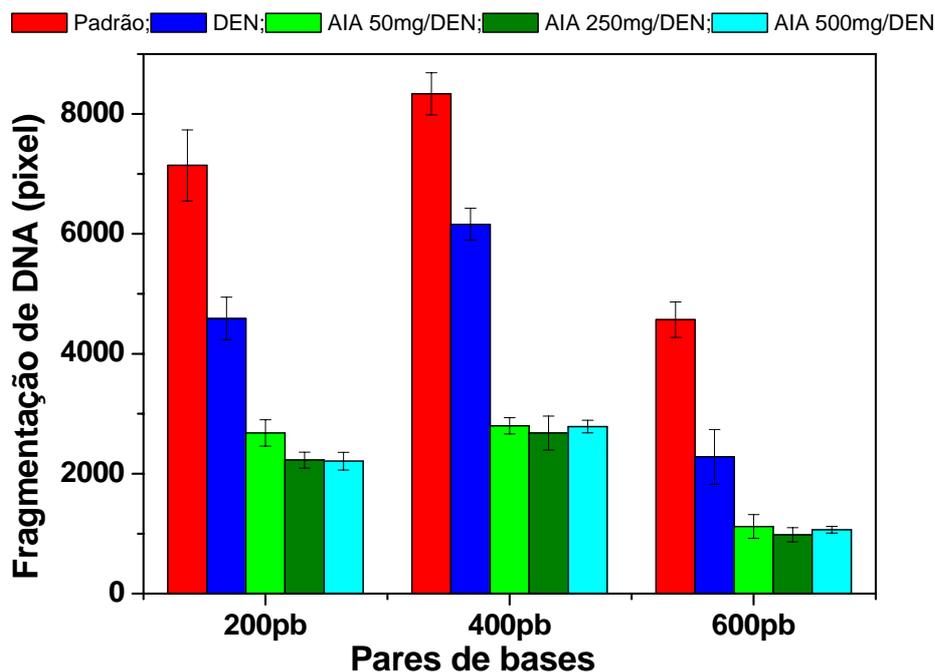


Figura 13. Fragmentação de DNA expressa pela densidade de “pixel” na banda de 200 pares de bases (pb), 400 pb e 600 pb avaliada no DNA padrão, no DNA dos animais expostos ao DEN por 24 horas e no DNA dos animais tratados com AIA 50 (AIA 50 mg/DEN), 250 (AIA 250 mg/DEN) e 500 (AIA 500 mg/DEN) mg/Kg de peso vivo e expostos ao DEN por 24 horas. As análises foram realizadas utilizando o programa de computador Image-J para três géis de eletroforese como descrito na Figura 11. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão para 3 animais de cada grupo.

6 DISCUSSÃO

O tratamento dos camundongos com ácido indol-3-acético não alterou a evolução do peso dos animais o peso relativo do fígado, mostrando que esta auxina, nas condições do estudo, não apresentou efeitos tóxicos tanto para os machos quanto para as fêmeas. Discussões semelhantes já foram realizadas por Oliveira (2007) ao trabalhar com suplementação de 1,5% de café liofilizado na alimentação de ratos Wistar, quando não encontrou diferença nem no ganho de peso dos animais e nem no peso relativo do fígado.

A exposição dos animais aos hepatocarcinógenos pode ocasionar um aumento do fígado dependendo da dose administrada e do tempo de indução do estresse. Schmähl e Steinhoff (1960) (citado por DILLENBURG et al., 2001) provocaram tumores hepáticos em quase todos os ratos de seu experimento, no período de 138 ± 10 dias, utilizando a dose de 5 mg/Kg/dia de DEN, ingerida diariamente.

Neste trabalho, os camundongos que receberam o hepatocarcinógeno DEN por um período de 4 horas ou por 24 horas, isoladamente ou conjuntamente com o tratamento com AIA não alteraram a evolução de peso e o peso relativo do fígado dos animais. Estes resultados mostraram que mesmo após 24 horas de indução do estresse pelo hepatocarcinógeno não foi detectada alteração no volume do fígado em relação ao peso vivo do animal. Esses resultados contrapõem em partes os resultados encontrados por Ohta et al., (2000) que também não observaram diferenças com relação ao peso relativo do fígado de ratos expostos ao tetracloreto de carbono (CCl_4) por 6 horas, porém 24 horas

após a exposição por CCl_4 , os pesos relativos dos fígados foram significativamente maiores em relação ao controle. Esses mesmos autores utilizaram nesse trabalho a melatonina como composto responsável pela reversão dos danos causados pelo CCl_4 em uma pós administração em três diferentes doses, porém também constataram que a melatonina não atenuou o aumento do peso relativo do fígado em nenhuma das três doses utilizadas (10, 50 e 100 miligramas por quilograma de peso vivo).

Como já foi descrito até agora, o órgão escolhido para a análise de dose resposta e de estresse oxidativo, foi o fígado. Com isso foi determinada, em ambas as etapas dos experimentos, as atividades das enzimas alanino amino transferase e aspartato aminotransferase no intuito de observar alterações causadas pelo tratamento com AIA e pela exposição do animal a hepatocarcinogênese, pois são enzimas indicativas de função hepática. Miltersteiner et al. (2003) também utilizou a determinação de ALT e AST em ratos cirróticos tratados com quercetina, um composto fenólico capaz de reverter a cirrose, e constatou um aumento significativo dessas enzimas nos animais cirróticos em relação aos que receberam o tratamento com quercetina. Por esse motivo, a determinação da atividade de ALT e AST, pode elucidar efeitos tóxicos ou estresses instalados no órgão.

Nesse trabalho, a atividade das enzimas ALT e AST dos animais tratados com AIA nas diferentes doses (50, 100, 200, 250, 500 miligramas por quilograma de peso vivo) não se alteraram, mostrando que as doses escolhidas e administradas por via intragástrica não causaram nenhum dano ao fígado durante o período de 15 dias do estudo, tanto para machos quanto para fêmeas.

Em contrapartida, Celik, Tuluçe e Isik (2006) trabalharam com outros hormônios de crescimento de plantas e analisaram sua influência sobre as enzimas, incluindo ALT e AST, de vários tecidos de ratos. Observaram então, que os hormônios utilizados (ácido 2,3,5- triiodobenzóico, ácido naftalenoacético e ácido 2,4-diclorofenoxiacético), afetaram a atividade das enzimas ALT e AST, alguns diminuindo e outros aumentando a atividade das mesmas.

Liu et al. (2001) observaram que ratos suplementados com ácido salvianólico-A tiveram um relevante efeito reversivo sobre danos fibróticos agudos e crônicos induzidos por tetracloreto de carbono, decrescendo significativamente a atividade de ALT e AST em comparação com animais fibróticos controles.

No presente estudo, o hepatocarcinógeno DEN aumentou a atividade das enzimas ALT e AST após 24 horas de exposição dos animais e não induziu alteração significativa na atividade destas enzimas após 4 horas. Entretanto, os resultados demonstraram que o AIA não protegeu o órgão desses animais contra os efeitos nocivos instalados pelo DEN sobre a atividade de ALT e AST, sugerindo que o tempo de 24 horas foi demasiadamente grande para se observar a ação desse hormônio de plantas sobre os efeitos do DEN.

Ohta et al. (2000), utilizaram CCl_4 para indução de estresse oxidativo por 6 e 24 horas e observaram um aumento significativo na atividade das enzimas AST e ALT em comparação com o grupo controle, sendo que em 24 horas o aumento da atividade de ambas as enzimas foi maior do que em 6 horas. No entanto, diferentemente do que foi observado nesse trabalho, o uso de um outro composto indólico, a melatonina, nas doses de 50 e 100 miligramas por quilograma de peso vivo em uma única administração após exposição do animal

ao CCl₄, foi capaz de reduzir a atividade dessas enzimas proporcionalmente às doses, tanto para 6 horas como para 24 horas.

No presente trabalho o ácido indol-3-acético foi testado como um possível antioxidante na proteção de estresse oxidativo hepático administrado por via intragástrica. Nesse sentido, foram determinadas as atividade das enzimas antioxidantes hepáticas SOD, CAT, GPx e GR dos camundongos. Os resultados encontrados demonstraram que os animais que receberam AIA isoladamente não aumentaram a atividade das referidas enzimas antioxidantes, o que sugere que a auxina não submeteu o órgão a uma ação tóxica por estresse oxidativo em nenhuma das doses utilizadas.

Trabalhos realizados por Ohta et al., (2004) utilizando a melatonina como composto indólico antioxidante, constataram que o tratamento com as doses de melatonina 10, 50, e 100 miligramas por quilograma de peso vivo em ratos, também não alteraram a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GR e GPx no fígado.

No presente estudo foi observado que, nos camundongos macho da 1^a etapa dos experimentos, houve uma redução das enzimas SOD, CAT e GPx para as doses de 100, 200 e 500 miligramas por quilograma de peso vivo sugerindo dessa forma uma provável ação antioxidante do composto. Resultados semelhantes, também, foram encontrados em estudos com ratos em que a administração de AIA reduziu a atividade de catalase e superóxido dismutase (Oliveira et al., 2007; Celik; Tuluçe; Turker, 2006; Celik; Tuluçe, 2006).

Porém, os resultados apresentados na 2^a etapa dos experimentos desta dissertação mostraram que administração de AIA (50, 250 e 500 miligramas de AIA por quilograma de peso vivo) não alterou a atividade de nenhuma das

enzimas antioxidantes para os machos controles, contrapondo os resultados encontrados na 1ª etapa, possivelmente pelo número reduzido de animais utilizados na formação dos grupos de estudo visto que houve uma tendência em reduzir a atividade de algumas enzimas antioxidantes nos animais tratados com AIA.

Com relação à atividade das enzimas antioxidantes nos machos e nas fêmeas, foi observado neste estudo que fêmeas controles apresentaram, em todas as enzimas, um perfil de atividade enzimática menor em comparação com as enzimas dos machos controles. Entretanto, em contrapartida, Viña et al., (2006) relataram que fêmeas possuem longevidade maior que os machos provavelmente pela produção de estrógeno, o que faz com que haja uma maior expressão gênica de enzimas antioxidantes do que nos machos. Com isso, esses autores realizaram testes em machos administrando um fitohormônio, estruturalmente semelhante ao estrógeno, e o efeito observado foi que houve aumento significativo de expressão gênica das enzimas antioxidantes sem ter causado o efeito feminilizante característico do estrógeno. Talvez com isso, se faça necessário ressaltar que, nesses trabalhos onde foi analisada maior longevidade feminina associada à maior expressão gênica de enzimas antioxidantes, foram realizados com vários animais incluindo ratos, porém não camundongos da linhagem BALB/c como os utilizados no presente estudo.

Pelo fato de somente os machos terem apresentado sensibilidade quanto à atividade de algumas enzimas antioxidantes, esse foi o sexo de escolha para a segunda etapa do experimento onde os animais foram submetidos ao estresse oxidativo induzido pelo hepatocarcinógeno DEN.

Os animais desafiados com o hepatocarcinógeno DEN apresentaram redução nas atividades das enzimas catalase e glutathiona redutase após exposição por 4 horas. Porém, o efeito nocivo do DEN sobre a atividade da CAT e GR foi eliminado nos animais que receberam previamente AIA antes da exposição destes por 4 horas ao carcinógeno, sugerindo uma ação antioxidante do hormônio de plantas ácido indol-3-acético.

Em relação ao possível efeito protetor do AIA encontrado neste estudo, Liu et al., (2001) já haviam constatado que o tratamento com ácido salvianólico-A, também um composto natural, protegeu hepatócitos em cultura, do estresse oxidativo induzido por CCl₄, avaliado pelas atividades das enzimas SOD, CAT, GR e GPx. Também com relação à atividade das enzimas antioxidantes associadas ao estresse oxidativo induzido pelo DEN juntamente com CCl₄, Dakshayani et al., (2005) observaram que o uso da melatonina, um outro composto indólico, reverteu a atividade das enzimas GR e GPx aos níveis normais, níveis esses que se encontravam aumentados pela indução do estresse.

Após 24 horas de exposição dos camundongos ao DEN não se observou alteração significativa nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GR. Isso pode ter ocorrido por uma possível adaptação do organismo ao estresse oxidativo, no sentido de aumentar a expressão gênica das enzimas antioxidantes no intuito de reverter os danos causados pelo DEN. Comprovando esse fato, Montera (2007) relata em seu trabalho que o estado redox mantido pelas enzimas antioxidantes, reduzem o aminoácido cisteína presente na molécula de Fatores de Transcrição, estimulando a ligação destes ao DNA e permitindo assim o desencadeamento de uma resposta gênica.

Porém, resultados observados por Fukumasu et al., (2006) contrapõe os resultados encontrados nesse trabalho, onde camundongos BALB/c submetidos ao hepatocarcinógeno DEN e sacrificados após 24 horas, tiveram o mRNA das enzimas antioxidantes hepáticas SOD, CAT e GR regulados para baixa expressividade na porcentagem de -38,2%, -78.6% e -72.9% respectivamente.

O perfil de adaptação foi discutido, também, por Tunali et al. (2005) em que foi detectada redução significativa nos níveis de GSH após 3 horas da ocorrência de queimadura em ratos e nenhum efeito nos níveis deste metabólito após 24 horas de queimadura.

Para que houvesse uma melhor elucidação das características não oxidantes do AIA foi avaliado também o perfil oxidativo hepático dos animais que receberam a auxina através da determinação da concentração de GSH e GSSG e pela relação GSH/GSSG. Os resultados mostraram que a suplementação dos animais com AIA não alterou nem nos níveis de GSH e GSSG e nem na relação entre as concentrações destes metabólitos, tanto para machos e quanto para fêmeas, o que confirma a ação não tóxica do AIA para as doses administradas por via intragástrica.

Em nenhum dos tempos de exposição, 4 horas ou 24 horas, dos animais ao hepatocarcinógeno DEN foram detectadas alterações significativas dos níveis hepáticos de GSH e GSSG, bem como na relação entre as suas concentrações. Esses resultados contrariam os resultados encontrados por Jaeschke, Knight e Bajt (2003) que observaram uma depleção celular do conteúdo de GSH em animais com hepatotoxicidade causada por overdose Acetaminofen. A metabolização desse fármaco gera um metabólito reativo (peroxinitrito) que causa a depleção de GSH hepática chegando a exaurir seus níveis, estabelecendo

estresse oxidativo extremo. Estes resultados controversos podem ser explicados pelo fato de que o Acetaminofen é uma droga sintética que foi utilizada em dose muito maior que a considerada terapêutica, ao contrário da auxina utilizada nesse trabalho que é um composto natural onde foram determinadas doses aceitáveis pelo animal utilizado.

No presente estudo verificou-se que o AIA agiu sobre os efeitos deletérios causados pelo DEN eliminando totalmente a ação deste sobre a redução da atividade de catalase e glutathione redutase e parcialmente sobre a fragmentação de DNA. Almeida et al. (2006), relataram a intensa fragmentação de DNA em ratos submetidos a estresse oxidativo por ferro, pois essa indução causa a geração excessiva de radical hidroxil, mostrando danos até mesmo no DNA mitocondrial desses animais.

No presente estudo avaliou-se a ação não oxidante do AIA através da integridade de DNA das células hepáticas dos animais tratados com esta auxina. Similarmente, não se observou fragmentação de DNA em neutrófilos e linfócitos de ratos tratados com AIA (40 miligramas de AIA por quilograma de peso vivo) (PUGINE et al., 2007; BRITO, 2006); contrariando os resultados de trabalhos anteriores em que mostraram que o AIA administrado *in situ* promoveu a fragmentação de DNA de neutrófilos ou de linfócitos na presença de peroxidase de raiz forte (DE MELO; LIMA; CURI, 2004).

Nesse estudo constatou-se que o hepatocarcinógeno DEN induziu fragmentação de DNA, cujos tamanhos dos fragmentos foram determinados em 210, 410 e 610 pares de bases após 24 horas de exposição do animal ao DEN. Enzmann et al. (2007) também encontraram resultados semelhantes ao realizar a fragmentação de DNA mitocondrial de fígado de peru que receberam DEN na

dose de 25 mg. Esses autores observaram fragmentos de DNA similares a 400 pares de bases encontrados nesse trabalho.

No presente estudo verificou-se que o DEN provocou a fragmentação de DNA sendo que este efeito foi significativamente reduzido quando os animais foram tratados, previamente, com a auxina ácido indol-3-acético. Esse resultado sugere que o AIA promoveu uma proteção parcial dos animais frente à ação nociva do DEN sobre a fragmentação de DNA. Resultados similares ocorreram em trabalhos realizados por Sivalokanathan, Ilayaraja e Balasubramanian; (2005) onde o extrato etanólico de *Terminalia arjuna*, uma planta rica em compostos polifenólicos, restaurou as vias antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, alteradas por indução do DEN sendo comprovado então, seu efeito antioxidante parcial também sobre a fragmentação de DNA.

Os mecanismos de ação do DEN na indução da hepatocarcinogênese ocorrem de outras formas além da geração de ERO. Arranz et al. (2006) relataram que a classe das *N*-nitrosaminas, requer ativação metabólica para exercer seus efeitos carcinogênicos e que a chave da via de ativação é catalisado por citocromo P450 ocorrendo a hidroxilação do carbono α do grupo nitroso. Relataram ainda, que os intermediários reativos do metabolismo das nitrosaminas, também tem a habilidade de alquilar sítios nucleofílicos de DNA. Assim, é esperado que a administração de um possível antioxidante atue parcialmente sobre os efeitos do DEN no fígado dos animais. Por esse motivo, é possível sugerir que o AIA somente foi capaz de proteger os danos do DEN no que diz respeito à formação de ERO, comprovando sua ação antioxidante. Similarmente a esses resultados, Fukumasu et al. (2007) demonstraram em seus estudos o efeito do guaraná (*Paullinia cupana*) em três doses, sobre danos

causados pelo DEN em fígados de camundongos e constataram que o guaraná promoveu um decréscimo em danos no DNA.

Para finalizar, com base nos resultados apresentados, é possível constatar que a realização deste trabalho contribuiu para testar a viabilidade da administração intragástrica do ácido indol-3-acético no que diz respeito à aceitação desse composto pelo sistema gastrintestinal, além de simular uma possível suplementação de antioxidantes naturais na alimentação, principalmente de animais de produção, no intuito de melhorar essa produção.

7 CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho foi possível concluir que o ácido indol-3-acético não possui efeito tóxico nas doses escolhidas (50, 100, 200, 250 e 500 mg/Kg de peso vivo) pois não alterou a evolução do peso, massa relativa do fígado, atividade de ALT e AST e perfil oxidativo hepático dos animais.

Frente a um estresse oxidativo induzido por DEN, avaliado pela redução da atividade das enzimas antioxidantes catalalase e glutaciona redutase e indução da fragmentação de DNA, conclui-se que ácido indol-3-acético promoveu um efeito antioxidante no fígado eliminando os efeitos deletérios causados pelo DEN sobre essas enzimas e DNA.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELL, A.; TUSSEL, J.M.; ARTIGAS, F.; MARTÍNEZ, E.; SUNÖL, C.; GELPI, E. Fluorometric Determination of Tryptophan and its Brain indoleamine Metabolites by Ion-Pair HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies** v.6, p. 527-541, 1983.

AHN, D.U. Meat irradiation and meat safety: Prevention of quality changes in irradiated meat and meat products. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND THECNOLOGY, 49, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: ITAL p.81-90, 2003.

AKINTONWA D.A. The derivation of nitrosamines from some therapeutic amines in the human environment. **Ecotoxicology Environmental**. v. 9, p. 64–70, 1985.

ALMEIDA, A.M.; BERTONCINI, C.R.A.; BORECKÝ, J.I.; SOUZA-PINTO, N.C; VERCESI, A.E. Mitochondrial DNA damage associated with lipid peroxidation of the mitochondrial membrane induced by Fe²⁺-citrate. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.78. p. 505-514, 2006.

ALVES, M.; GONZÁLEZ, F.; CARVALHO, F. MÜHLBACH, P.; LIMA,V.; CONCEIÇÃO, T.R.; WALD, V. Alimentação de vacas leiteiras com subprodutos de soja: efeitos sobre o perfil metabolic. **Ciência Rural**. v.34, p. 239-243, 2004.

ANDRADE, E.R.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A.; DE OLIVEIRA, J.A.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; FIGUEIREDO, J.R.; TONIOLLI, R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**. v. 64, p. 1104-1113, 2005.

ARRANZ, N.; HAZA, A.I.; GARCÍA, A.; MÖLER, L.; RAFTER, J.; MORALES, P. Protective effects of isothiocyanates towards *N*-nitrosamine-induces DNA damge in single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. **Journal of Applied Toxicology**. v. 26, p. 493-499, 2006.

ARRANZ, N.; HAZA, A.I.; GARCÍA, A.; MÖLER, L.; RAFTER, J.; MORALES, P. Protective effects of organosulfur compounds towards *N*-nitrosamine-induces DNA damge in single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. **Food and Chemical Toxicology**. v. 45, p. 1662-1669, 2007.

BARJA DE QUIROGA, G., Brown fat thermogenesis and exercise: two examples of physiological oxidative stress?. **Free Radical Biological Medicinal**, v. 13, p. 325-40, 1992.

BASSAN, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M.; Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**. Jul; v.196 p. 80-83,1991.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.

BEEHLER, C.J.; SIMCHUK, M.L.; TOTH, K.M.; DRAKE, S.K.; PARKER, N.B.; WHITE, C. W.; BERGER, E.M.; SANDERSON, R.J.; REPINE, J.E. Blood sulfhydryl level increases during hyperoxia: a marker of oxidant lung injury. **Journal of Applied Physiology**, v. 67, p. 1070-1075, 1989.

BEERS, R.F.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 133-140, 1952.

BEKHIT, A. E. D.; ILIAN, M. A.; MORTON, J. D.; VANHANAN, L.; SEDCOLE J. R.; BICKERSTAFFE, R. Effect of calcium chloride, zinc chloride, and water infusion on metmyoglobin reducing activity and fresh lamb color. **Journal of Animal Science**. v. 83, p. 2189-2204, 2005.

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

BREWER, S. Irradiation effects on meat color – a review. **Meat Science**. v. 68, p. 1-17, 2004.

BRITO, P. P. **Influência do ácido indol-3-acético na capacidade e na integridade celular de neutrófilos de ratos**. 2006. 61 f.. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

CANDEIAS, L.P.; FOLKES, L.K.; PORSSA, M.; PARRICK, J.; WARDMAN, P. Enhancement of lipid-peroxidation by indole-3-acetic acid and derivatives-substituent effects. **Free Radical Research**. v. 23, p. 403-418, 1995

CANDEIAS, L.P.; WARDMAN, P.; MASON, R.P. The reaction of oxygen with radical from oxidation of tryptophan and indole-3-acetic acid. **Biophysical Chemistry**. v.67, p. 229-237, 1997.

CANO, A.; ALCARAZ, O.; ARNAO, M.B. Free radical-scavenging activity of indolic compounds in aqueous and ethanolic media. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 376, p. 33-37, 2003.

CARLBERG, I.; MANNERVIK B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**. v. 113, p. 484-490,1985.

CARVALHO, J.M.; MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M.; MAIA JUNIOR, G.A. Água-de-coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **SEMINA: Ciências Agrárias**. v. 27, p. 437-452, 2006.

CASTILLO, C.; HERNANDEZ, J.; BRAVO, A.; LOPEZ-ALONSO, M.; PEREIRA, V. BENEDITO, J. L. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. **Veterinary Journal**. v. 169, p. 286-292, 2005.

CELIK, I.; TULUCE, Y. Effect of indoleacetic acid and kinetic on lipid peroxidation and antioxidant defense in various tissues of rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 84, p. 49-54, 2006.

CELIK, I.; TULUCE, Y.; ISIK, I. Influence of subacute treatment of some plant growth regulators on serum marker enzymes and erythrocyte and tissue antioxidant defense and lipid peroxidation in rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. v. 20, p. 174-182, 2006.

CELIK, I.; TULUCE, Y.; TURKER, M. Antioxidant and immune potential marker enzymes assessment in the various tissues of rats exposed to indoleacetic acid and kinetin: A drinking water study. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 86, p.180-185, 2006.

CHEN, C.; KONG, T. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. **Free Radical Biology and Medicine**. v.36, p. 1505-1516, 2004.

CHUN, S.S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**. v.40, p. 809–816, 2005.

CLAYSON, D. B.; ARNOLD, D. L. The classification of carcinogens identified in the rodent bioassay as potential risks to humans: What type of substance should be tested next? **Mutation Research**. v. 257, p. 91-106, 1991.

CORSINO, J.; SILVA, D. H. S.; ZANONI, M. V. B.; BOLZANI, V.S.; FRANÇA S. C.; , PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Antioxidant Flavan-3-ols and Flavonol Glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytotherapy Research**. v. 17, p. 913–916, 2003

COTELLE, A.C. Antioxidant proprieties of hydroxy-flavones. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 21, p. 35-43, 1996.

DA SILVA, T.C.; DA SILVA, A.P.; AKISUE, G., AVANZO, J.L.; NAGAMINE, M.K.; FUKUMASU, H.; MATSUZAKI, P.; RASPANTINI, P.C.; HARAGUCHI, M., GORNIK, S.L.; DAGLI, M.L.Z. Inhibitory effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on preneoplastic and neoplastic lesions in a mouse hepatocarcinogenesis model. **Cell Biochemistry and Function**. v. 226, p. 107-113, 2005.

DAKSHAYANI, K.B.; SUBRAMANIAN, P.; MANIVASSAGAM, T.; ESSA, M.; MANOHARAN, S. Melatonin Modulates The Oxidant-Antioxidant Imbalance During N-Nitrosodiethylamine Induced Hepatocarcinogenesis in Rats. **Journal Pharmacy Pharmaceutical Science**. v. 8, p. 316-321, 2005.

DAS, S.K.; VASUDEVAN, D.M. Essential factors associated with hepatic angiogenesis. **Life Science**. v. 81, p. 1555-1564, 2007.

DE MELO M.P.; ESCOBAR, J.A.; METODIEWA, D.; DUNFORD, H.B.; CILENTO, G. Horseradish Peroxidase-Catalysed Aerobic Oxidation of Indol Acetic Acid : Oxygen Uptake And Chemiexcitation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 296, p. 34-39, 1992.

DE MELO, M. P.; PHITON-CURI, T. C. P.; CURI, R. Indole-3-acetic acid increases glutamine utilization by high peroxidase activity-presenting leucocytes. **Life Sciences**. v.75, p.1713-1725, 2004.

DE MELO, M. P.; PHITON-CURI, T. C. P.; CURI, R.; DI MASCIO, P.; CILENTO, G. Peroxidase activity may play a role in the cytotoxic effect of indole acetic acid. **Photochemistry and Photobiology**. v.65, p. 338-341, 1997.

DE MELO, M. P.; PHITON-CURI, T. C. P.; MIYASAKA, C. K.; PALANCH, A. C.; CURI, R. Effect of indole acetic acid on oxygen metabolism in cultured rat neutrophils. **General Pharmacology**. v.31, p. 573-578, 1998.

DE MELO, M.P.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, R. Indole-3-acetic increases glutamine utilization by high peroxidase activity-presenting leukocytes. **Life Science**. v. 75, p. 1713-1725, 2004.

DEAL, F.H.; RICHARDSON, F.C.; SWENBERG, J.A. Dose Response of Hepatocyte Replication in Rats following Continuous Exposure to Diethylnitrosamine. **Cancer Research**. v. 49. p. 6985-6988, 1989.

DESHPANDE, S.S.; SANTHE, S.K.; SALUNKHE, D.K. Chemistry and safety of plants polyphenols. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 177, p. 457-495, 1984.

DILLENBURG, W.; POULAKIS, V.; SKRIAPAS, K.; DE VRIES, R.; FERAKIS, N.; WITZSCH U.; MELEKOS, M.; BECHT, E. Retroperitoneoscopic Versus Open Surgical Radical Nephrectomy for Large Renal Cell Carcinoma in Clinical Stage cT2 or cT3a: Quality of Life, Pain and Reconvalescence. **European Urology**. v. 49, p. 314-323, 2001.

DOGBEVI, M. K.; VACHON, C.; LACROIX, M. Physicochemical and microbiological changes in irradiated fresh pork loins. **Meat Science**. v. 51, p. 349-354, 1999.

DRAGAN, Y.P.; PITOT, H.C. Multistage hepatocarcinogenesis in the rat: Insights into risk estimation. **IN RELEVANCE OF ANIMAL STUDIES TO THE EVALUATION OF HUMAN CANCER RISK**. Wiley, New York. p. 261-279,1992.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**. v. 82 p. 47-95, 2002.

DUA, L.S.; CHANDRA, M. The identification and isolation of plant growth regulating substances from the liquid endosperm of *Cocos nucifera*. **Coconut Research and Development**. p. 219-227, 1993.

DUARTE, J.A.; APPELL, H.J.; CARVALHO, F.; SOARES, J.M. Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage. **International Journal of Sports Medicine**. v.14, p. 440-3, 1993.

ENGELBERGS, J.; THOMALE, J.; RAJEWSKY, M.F. Role of DNA repair in carcinogen-induced ras mutation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v. 450, n. 1-2, p.139-153, 2000.

ENZMANN, R.; DACHS, S.; MEYER, R.; FINLEY, J., AMANN, M.C. Formation of self-assembled quantum dots on AlInAs and GaInAs matrices using a GaSb sublayer. **Applied Physics Letters**. 2007.(*in press*).

ESCOBAR, J.A.; VÁSQUEZ-VIVAR, J.; CILENTO, G. Free radicals and excited species in the metabolism of indole-3-acetic acid and its ethyl ester by horseradish peroxidase and by neutrophils. **Photochemistry and Photobiology**. v. 55, p.895-902, 1992.

ESPANDIARIA, P.; ROBERTSON, L.W.; SRINIVASANC, C.; GLAUERT, H.P. Comparison of different initiation protocols in the resistant hepatocyte model. **Toxicology**. v. 206, n. 3, p. 373-381, 2005.

FAUSTO, N.; VAIL, M.E.; PIERCE, R.H.; FRANKLIN, C.C.; CAMPBELL, J. Interactions between cell proliferation and apoptosis in the development and progression of liver tumours. **Malignant liver tumours**. v. 59; p. 5017-5022, 1999.

FENSTER, C.P.; WEINSIER, R.L.; DARLEY-USMAR, V.M.; PATEL, R.P. Obesity, aerobic exercise and vascular disease: the role of oxidante stress. **Obesity Research**. v.10, p. 964-968, 2002.

FERREIRA, A.L.A.; LIMA, L. M. A.; MATSUBARA, L. S. Glutathione: O antioxidante. Síntese, metabolismo e degradação. **Jornal Brasileiro de Medicina**. v. 73, p. 93-102, 1997.

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

FOLKES, L. K.; DENNIS, M. F.; STRATFORD, M. R. I.; CANDEIAS, L. P.; WARDMAN, P. Peroxidase-catalyzed effects of indole-3-acetic acid and analogues

on lipid membrane, DNA, and mammalian cell in vitro. **Biochemical Pharmacology**. v. 57, p.375-382, 1999.

FOLKES, L. K.; WARDMAN, P. Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species – a potential new role for plant auxins in cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**. v. 61, p.129-136, 2001.

FUJIMOTO, Y.; MARUTA, S.; YOSHIDA, A.; FUJITA, T. Effect of transition metal ions on lipid peroxidation of rabbit renal cortical mitochondria. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**. v. 44, p. 495-8, 1984.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J.L.; HEIDOR, R.; SILVA, T.C.; ATROCH, A.; MORENO, F.S.; DAGLI, M.L.Z. Protective effects of guarana, *Paullinia cupana* Mart. var.sorbilis, against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food Chemistry Toxicology**. v. 44, p. 862-867, 2006

FUKUMASU, H.; LATORRE, A.O.; AVANZO, J.L.; SILVA, C.T.; PUGINE, S.M.P.; DE MELO, M.P.; RAO, K.V.K.; DAGLI, M.L.Z. Guarana(*Paulinia cupana*) reduces carcinogen-induced DNA damage and MGM2 activation trough altered P450 expression and increased superoxide dismutase activity in mice liver. **Food and Chemical Toxicology**. 2007. (*in press*).

FUKUMASU, H.; NAGAMINE, M. K; DEMANGE, L. K; SAKAI, M; ATROCH, A; BARBUTO, J. B; DAGLI, M. L. Z. Anti-proliferative effects of guarana (*Paullinia cupana mart var. sorbilis*) in pulmonary melanoma colonies. **Applied Cancer Research Supplement** . v. 145, S96-96, 2005.

FUKUMASU, H.; SILVA, T.C.; AVANZO, J.L.; LIMA, C.E.; MACKOWIAK, I.I.; ATROCH, A.; SPINOSA, H.D.; MORENO, F.S.; DAGLI, M.L.Z. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart. var.sorbilis, the guarana, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letter**. v. 233, p. 158-164, 2006.

GALSTON, A.W.; PURVES, W.K. The mechanism of action of auxin. **Ann. Review Plant Physiology**. v.11, p.239-276, 1960.

GOLDFARB, A.H. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. Indianapolis, v.25, p.232-236, 1993.

GORDON, S. A.; BARR, S.; FRY, R. J. M. Origin of urinary auxin in germfree and conventional mouse. **American Journal of Physiology**. v.222, p.339-403, 1972.

GRECO, O.; DACHS, G.U.; TOZER, G.M.; KANTHOU, C. Mechanisms of cytotoxicity induced by horseradish peroxidase / indole-3-acetic acid gene therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 87, p. 221-232, 2002.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization methodology and mechanism. **Biochemistry Pharmacology**. v. 49, p. 1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: A personal view. **Nutrition Reviews**. v. 52, p. 253-65, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed, Oxford University Press, Oxford, UK, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**. v. 186, p. 1-85, 1990.

HARRIS, G. K. ; GUPTA A.; NINES, R. G.; KRESTY L. A.; HABIB, S. G.; FRANKEL, W. L.; LAPERLE, K.; GALLAHER, D. D.; SCHWARTZ, S. J.; STONER, G. D. Effects of Lyophilized Black Raspberries on Azoxymethane-Induced Colon Cancer and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Levels in the Fischer 344 Rat. **Nutrition and Cancer**. v. 40, p. 125-133, 2001.

HARRIS, S. E.; HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN, S. M.; JONES, W. R.; RANKINS, D. Antioxidant status affects color stability and tenderness of calcium chloride-injected beef. **Journal of Animal Science**. v. 79, p. 666-677, 2001.

HAVEMOSE, M.S.; WEISBJERG, M.R.; BREDIE W.L.P.; NIELSEN, J.H. Influence of feeding different types of roughage on the oxidative stability of milk. **International Dairy Journal**. v. 14, p. 563-570, 2004.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**. v. 26, p. 277-285, 1989.

HU, T.; DRYHURST, G. Electrochemical and peroxidase O₂-mediated oxidation of indole-3-acetic acid at physiological pH. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v. 432, p. 7-18, 1997.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans**. 184 p. 1972.

Disponível em: <<http://www.iarc.fr>>. Acesso em 23 set. 2007

JAESCHKE, H.; KNIGHT, T.R.; BAJT, M.L. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicology Letters**. v. 144, p. 279-288, 2003.

JI, L.L.; STRATMAN, F.W.; LARDY, H.A. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. **Archives of Biochemistry and Biophysics** . v. 263, p. 150-601, 1988.

KARBOWNIK, M.; STASIAK, M.; ZYGMUNT, A.; ZASADA K.; LEWINSKI, A. Protective effects of melatonin and indole-3-propionic acid against lipid peroxidation, caused by potassium bromate in the rat kidney. **Cell Biochemistry and Function**. v. 24, p. 483 - 489, 2000.

KEYNES, R.G.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. **Current Molecular Medicine**. v. 4, p.179-191, 2004.

LACROIX, M. L.; SMORAGIEWICZ, W.; JOBIN, M.; LATREILLE, B.; KRZYSTYNIAK, K. The effect of irradiation of fresh pork loins on the protein quality and microbiological changes in aerobically - or vacuum-packaged. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 63, p. 317-322, 2002.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**. v. 27, p. 969-978, 1988.

LAURIDSEN, C.; NIELSEN, J. H.; HENCKEL, P.; SORENSEN, M. T. Antioxidative and oxidative status in muscles of pigs fed rapeseed oil, vitamin E and copper. **Journal of Animal Science**. v. 77, p. 105-115, 1999.

LIAO, M.; WANG, H.; LIN, Z.; FENG, J.; ZHU, D. Vascular endothelial growth factor and other biological predictors related to the postoperative survival rate on non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**. v. 33, p. 125-32, 2001.

LINS, P. G.; VALLE, C. R.; PUGINE, S. M. P.; OLIVEIRA, D. L.; FERREIRA, M, S. L.; COSTA, E. J. X.; DE MELO, M. P. Effect of índole acetic acid administration on the neutrophils functions and oxidative stress neutrophils, mesenteric lymph node and liver. **Life Sciences**, v. 78, p. 564-570, 2006.

LIU, J.W.; ZHANG, X.D.; YANG, F.; LI, T.; WEI, D.Z.; REN, Y.H. Antimetastatic effect of a lipophilic ascorbic acid derivative with antioxidation through inhibition of tumor invasion. **Cancer Chemotherapy Pharmaceutical**. v. 57, p. 584-590, 2006.

LIU, P.; HU, Y.; LIU, C.; LIU, C.; ZHU, D. Effects of salviainolic acid A (SA-A) on liver injury: SA-A action on hepatic peroxidation. **Liver**. v. 21, p. 384- 390, 2001.

MARCHIORO, L.E.T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 74f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MARTÍNEZ, E.; ARTIGAS, F.; SUÑOL, C.; TUSSEL, J. M.; GELPÍ, E. Liquid-chromatographic determination of indole-3-acetic acid and 5-hydroxy-indole-3-acetic acid in human plasma. **Clinical Chemistry**. v. 29, p. 1354-1357, 1983.

MELLO-FILHO, A.C.; HOFFMAN, M.E.; MENEGHINI, R.; Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemistry Journal**. v. 218, 273-275. 1983.

MELO, G.B.; SILVA, R.L.; FAKHOURI, R.; MELO, V.A.; LIMA, S.O. Efeito do omeprazol e do pantoprazol sobre a regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 18, p. 542-544, 2003.

MENEZES, H. Própolis: Uma revisão: os recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 72, p. 405-411, 2005

MILLS, M. H.; FINLAY, D. C.; HADDAD, P. R. Determination of melatonin and monoamines in rat pineal using reversed-phase ion-interact chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, v. 564, p. 93-102, 1991.

MILTERSTEINER, A.; MILTERSTEINER, D.; PEREIRA FILHO, N.; FROTA, A.R.; ELY P.B.; ZETTLER, C.G.; MARRONI, C.A.; MARRONI, N.P. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 18, p. 232-237, 2003.

MONTERA, V.S.P. Benefícios dos Nutrientes Antioxidantes e seus Cofatores no Controle do Estresse Oxidativo e Inflamação na Insuficiência Cardíaca. **Revista da SOCERJ**. v. 20, p. 20-27, 2007

NDIWENI, N.; FINCH, J.M. Effects of in vitro supplementation with a -tocopherol and selenium on bovine neutrophil functions: implications for resistance to mastitis. **Veterinary Immunology Immunopathology**. v. 51, p. 67-78, 1996.

OHTA, Y.; KONGO, M.; SASAKI, E.; NISHIDA, K.; ISHIGURO, I. Therapeutic effect of Melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. **Journal of Pineal Research**. v. 28 P. 119-126, 2000.

OHTA, Y.; KONGO-NISHIMURA, M.; HAYASHI, T.; KISHIKAWA, T. Effect of Oren-gedoku-to (Huanglian-Jie-Du-Tang) extract on disruption of hepatic antioxidant defense systems in rats treated with D-galactosamine. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 94, p. 323-329, 2004.

OKADA, Y.; KANEKO, M.; OKAJIMA, H. Hydroxyl radical scavenging activity of naturally occurring furanfatty acids. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v.19, p.1607-1610, 1996.

OLIVEIRA, D.L.; PUGINE, S.M.P.; FERREIRA, M.S.L; LINS, P.G.; COSTA, E.J.X.; DE MELO, M.P. Influence of indole acetic acid on antioxidant levels and enzyme activities of glucose metabolism in rat liver. **Cell Biochemistry and Function**, v. 25, p. 195-201, 2007.

OLIVEIRA, E.M.S. **Efeito modulador do café sobre a carcinogênese hepática induzida em ratos**. 2007. 65f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, p.158-169, 1967.

PASCHOAL, J.J.; ZANETTI, M.A.; CUNHA, J.A. Contagem de células somáticas no leite de vacas suplementadas no pré-parto com selênio e vitamina E. **Ciência Rural**. v . 36, p. 1462-1466. 2006.

PITOT, H.C.; DRAGAN, Y.P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **The FASEP Journal**. v. 5, p. 2280-2286, 1991.

PLAČEK, V.; SVOBODOVÁ, V.; BARTONÍČEK, B.; ROSMUS, J.; ČAMRA, M. Shelf-stable food through high dose irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 71, p. 515-518, 2004.

POLITIS, I.; HIDIROGLOU, M.; BATRA, T.R.; GILMORE, J.A.; GOREWIT, R.C.; SCHERF, H. Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. **American Journal Veterinary Research**. v. 56, p.179-84, 1995.

POULSEN, H.E.; JENSEN, B.R.; WEIMANN, A.; JENSEN, S.A.; SORENSEN, M.; LOFT, S. Antioxidants, DNA damage and gene expression. **Free Radical Research**. v. 33. p. S33-9, 2000.

PRADEEP, K.; MOHAN,C.V. R.; GOBIANAND,K.; KARTHIKEYAN, S. Silymarin modulates the oxidant–antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 560, p. 110–116, 2007.

PUGINE, S.M.P.; BRITO, P.P.; ALBA, T.C.; COSTA, E.J.X. ; CURI, R.; DE MELO, M.P. Comparative effects of indole acetic acid administration by gavage and subcutaneous on rat leukocyte function. **Cell Biochemistry and Function**. v. 25, p. 723-730, 2007.

RENTFROW, G.; LINVILLE, M. L.; STAHL, C. A.; OLSON, K. C.; BERG, E. P. The effects of the antioxidant lipoic acid on beef longissimus bloom time. **Journal of Animal Science**. v. 82, p. 3034-3037, 2004.

RODRIGUEZ, T.; ALTIERI, A.; CHATENOU, L.; GALLUS, S.; BOSETTI, C.; NEGRI, E.; FRANCESCHI, S.; LEVI, F.; TALAMINI, R.; LA VECCHIA, C. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. **Oral Oncology**. v. 40, p. 207-213, 2004.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**. v. 24, p. 112-119, 2001.

ROWE, L. J.; MADDOCK, K. R.; LONERGAN, S. M.; HUFF-LONERGAN, E. Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. **Journal of Animal Science**. v. 82, p. 785-793, 2004.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. **Fitoterapia**. v.73, p. S30-S37, 2002.

SALLES, M.G.F. Água de coco (*Cocos nucifera*) in natura e sob a forma de gel e estabilizada como diluidor de sêmen caprino. Porto Alegre, RS, 1989. 176p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold, Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring. New York, 2001.

SATO, M.; UMEKI, H.; SAITO, R.; KANAI, A.; AND TOMITA, M. Computational analysis of stop codon readthrough in *D. melanogaster*. **Bioinformatics**. v. 19, p. 1371–1380, 2003.

SCHMÄHL, D.; STEINHOFF, D. Experimental carcinogenesis in rats with colloidal silver and gold solutions. **Zeitung Krebsforsch**. v. 63, p. 586-591, 1960.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**. v. 215, p. 213-219, 1993.

SIGNORI, J.L.; SIGNORINI, S.L. **Atividade física e radicais livres. Aspectos biológicos, químicos, fisiopatológicos e preventivos**. Editora Universidade de São Paulo, 1993.

SIVALOKANATHAN, S.; ILAYARAJA, M.; BALASUBRAMANIAN, M. P. Efficacy of *Terminalia arjuna* (Roxb.) on N-nitrosodiethylamine induced hepatocellular carcinoma in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 43, p. 264-267, 2005.

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

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione - applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical and Biochemistry**. v. 27, p. 502-522, 1969.

TONIOLLI, R.; BUSSIÈRE, J.; COUROT, M.; MAGISTRINE, M.; COMBARNOUS, Y. Effect of indole-3-acetic acid (plant auxin) on the preservation at 15°C of boar semen for artificial insemination. **Reproduction Nutrition Development** . v. 36, p. 503-511, 1996.

TUNALI, T.; SENER, G.; YARAT, A.; EMEKLI, N. Melatonin reduces oxidative damage to skin and normalizes blood coagulation in a rat model of thermal injury. **Lifes Sciences**. v. 76, p. 1259-1265, 2005.

TUSSELL, J. M.; ARTIGAS, F.; SUNOL, C.; MARTINEZ, E.; GULP, E. Comparison of high-performance liquid-chromatography and gas-chromatography mass-spectrometry for the analysis of indole-3-acetic acid in brain-tissue. **Journal of Chromatography**. v. 306, p.338-344, 1984.

UCHOA, D. C.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; PEREIRA, B. S.; SILVA, L. D. M. Conservação do sêmen canino a 37°C em diluentes à base de água de coco. **Ciência Rural**. v. 32, p. 91-95, 2002.

URSO, M.L., CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**. v. 189, p. 41-54, 2003.

VALLE, C. R. **Estudo da influência da suplementação de vitamina E nas atividades funcionais dos neutrófilos do leite de bovinos**. 2005. 82 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S.; RIZZARDI, M.A.; SILVA, V.C. Alteração das características biológicas dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) ocasionada pela resistência ao herbicida Glyphosate. **Planta Daninha**. v. 23, p. 153-160, 2005.

VIÑA, J.; SASTRE, J.; PALLARDO, F.V.; GAMBINI, J.; BORRÁS, C. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders. Protective effect of estrogens. **Free Radical Research**. v. 12, p. 1359-1365, 2006.

WEISSBACH, H.; KING, W.; SJOERDSMA, A.; UNDEFRIED, S. Formation of indole-3-acetic acid and tryptamine in animals: a method for estimation of indole-3-acetic acid in tissue. **Journal of Biology Chemistry**. v. 234, p. 81-86, 1959.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**. v. 74, p. 139-62, 1994.

ANEXO 1. Protocolo da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo, referente ao projeto envolvendo camundongos BALB/c.



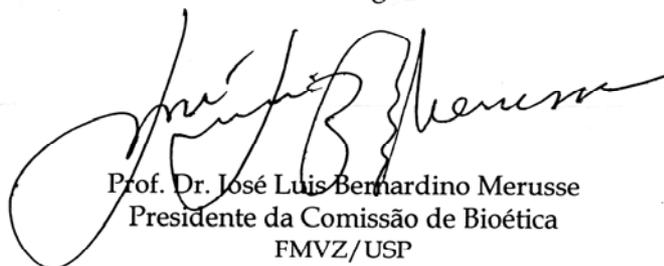
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos efeitos antioxidantes do ácido indol acético na hepatocarcinogênese induzida", protocolado sob o nº952/2006, utilizando 40 (quarenta) camundongos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/08/06".

(We certify that the Research "Antioxidants evaluation effects of indol acetic acid in induced hepatocarcinogenesis", protocol number 952/2006, utilizing 40 (forty) mice, under the responsibility of Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 08/16/2006).

São Paulo, 17 de agosto de 2006



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP