

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

ELDER LUCIANO DEODATO

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E
MUTAGÊNICO DE MISTURAS 3:1 DE NUTRIÇÃO
PARENTERAL VOLTADAS PARA PACIENTES NEONATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCELO DE PÁDULA
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ALVARO AUGUSTO C. LEITÃO

RIO DE JANEIRO
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ELDER LUCIANO DEODATO

CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL
GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DE
MISTURAS 3:1 DE NUTRIÇÃO
PARENTERAL VOLTADAS PARA
PACIENTES NEONATOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Pádula
Co-Orientador: Prof. Dr. Alvaro Augusto C.
Leitão

Rio de Janeiro
2009

D418c

Deodato, Elder Luciano.

Caracterização do potencial genotóxico e mutagênico de misturas 3:1 de nutrição parenteral voltadas para pacientes neonatos / Elder Luciano Deodato; orientadores Marcelo de Pádula, Alvaro Augusto C. Leitão. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2009.
xvi, 101f. : il. col. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRJ / Faculdade de Farmácia, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Nutrição parenteral. 2. Genotoxicidade. 3. Mutagenicidade.
I. Pádula, Marcelo de. II. Leitão, Alvaro Augusto C. III. Título.

CDD 612.3

Elder Luciano Deodato

**Caracterização do potencial genotóxico e mutagênico de misturas 3:1 de nutrição
parenteral voltadas para pacientes neonatos.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 15 de Maio de 2009.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Pádula
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Faculdade de Farmácia

Co-Orientador: Prof. Dr. Alvaro Augusto C. Leitão
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Banca examinadora: Prof. Dr. Adriano Caldeira de Araújo
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Banca examinadora: Prof^ª. Dr^ª. Claudia de Alencar Santos Lage
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Banca examinadora: Prof^ª. Dr^ª. Valeria Pereira de Souza
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Faculdade de Farmácia

*“Eu encontrei-a quando não quis
mais procurar o meu amor
e o quanto levou foi pra eu merecer
antes de um mês e eu já não sei
e até quem me vê lendo jornal
na fila do pão sabe que eu te encontrei”*

(Último Romance – Los Hermanos)

À pessoa que mudou minha vida,
que tornou felizes dias que já não esperava mais,
que me dedicou sorrisos e lágrimas,
e a quem dedico amor sem fim,
Cynthia Ferreira da Silveira,
esposa amada, inspiração dos meus dias.

AGRADECIMENTOS

No caminho traçado durante o percurso deste trabalho tive apoio incondicional de pessoas pelas quais guardo enorme gratidão.

Marcelo de Pádula, pessoa fantástica que me acolheu em orientação e soube me manter no caminho traçado, que com paciência e perseverança acompanhou todo o trabalho realizado e por quem tenho profunda admiração.

Alvaro Augusto C. Leitão, doutor de inteligência e sagacidade fantásticas, indispensável para a conclusão deste trabalho.

Janine Simas Cardoso Rurr, pessoa admirável, que com seu apoio técnico dedicado e paciência ao me ensinar, foi presente em todo momento e de quem guardo sorrisos incríveis.

Os formidáveis farmacêuticos e técnicos da Nutriente-Farmácia, queridos colegas de trabalho, pessoas tão importantes no convívio de todo dia, que com paciência me apoiaram e tornaram possível o andamento de todo processo. Os farmacêuticos *Leonardo, Daniela Costa, Uilian, Rafael Lopes e Bianca*. Os técnicos *Sandra, Lorreine, Fernando, Rodrigo, Rafael Câmara, Bruno, Edvaldo e Damião*. Todos vocês, nobres colegas, são parte disso. Obrigado!

Daniela de Oliveira Ribeiro, pra sempre chefinha querida, a pessoa que me apontou para esse caminho e que em 7 anos de convivência profissional, em todos os momentos bons ou ruins, foi sempre importante. Devo a você muito do que sou hoje.

Jorge e Francisca Deodato, papai e mamãe, que acompanharam todo o processo com a felicidade de pais que vêm seu filho crescendo e orgulhosos das conquistas alcançadas.

Cleber, Fábio e Fausto, irmãos queridos.

Gisela Maria Dellamora Ortiz e Valéria Pereira de Souza, pela paciência e conselhos.

CAPES e FAPERJ, pelo apoio concedido.

Colegas de laboratório, pelos momentos de descontração.

As *bactérias* que deram suas vidas durante a jornada. Valeu ae!

Raquel e Hélio, pais da Nutriente, a quem devo gratidão pelas amostras cedidas.

E *Cynthia Ferreira da Silveira*, minha morena, por tudo que foi partilhado, alegrias e tristezas, e por ser quem você é. Te amo muito!

Muito obrigado a todos!

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

3:1 - Três em um

8-oxoG - 7,8-dihidro-8-oxoguanina

ASPEN - Sociedade Americana de Nutrição Parenteral e Enteral

CuZn-SOD - Cobre-Zinco-superóxido dismutase

ERO - Espécies reativas de oxigênio

ESPEN - Sociedade Européia de Nutrição Parenteral e Enteral

FPG - Formamidopirimidina-DNA-glicosilase

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HO· - Radical hidroxil

LOO· - Radical peroxila lipídico

NP - Nutrição Parenteral

¹O₂⁻ - Oxigênio singlete

O₂^{-·} - Radical superóxido

RDC 272 - Resolução de Direção Colegiada nº 272

SBNPE - Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral

SOD - Superóxido dismutase

TCL - Triglicerídeos de Cadeia Longa

TCM - Triglicerídeos de Cadeia Média

TNE - Terapia Nutricional Enteral

TNP - Terapia Nutricional Parenteral

UTI NEO - Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

RESUMO

DEODATO, Elder Luciano. Caracterização do potencial genotóxico e mutagênico de misturas 3:1 de nutrição parenteral voltadas para pacientes neonatos. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2009.

A Nutrição parenteral (NP) é uma forma de disponibilizar intravenosamente nutrientes essenciais ao desenvolvimento humano, quando a alimentação via oral ou enteral não é possível. É caracterizada como uma mistura de nutrientes na qual diversas reações podem ocorrer, colocando em risco sua estabilidade físico-química. Ocorrem reações de oxidação na NP influenciadas pela temperatura, pela luminosidade e pelos próprios constituintes. Na presença de oxigênio, podem produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) capazes de danificar estruturas genéticas. Neonatos prematuros, incapazes de absorver alimentos por sua imaturidade intestinal, possuem seu sistema de defesa antioxidante ainda frágil. O estresse oxidativo pode gerar lesões oxidativas no DNA, tendo como principal delas a 8-oxoguanina (8-oxoG). Tal lesão, se fixada no código genético pode causar mutações, podendo levar a condições genético degenerativas em longo prazo. Em *E. coli*, existem enzimas capazes de corrigir o pareamento incorreto de bases causado por 8-oxoG, chamadas MutY, MutM e MutT. O conhecimento do mecanismo de defesa bacteriano contra lesões no DNA, e sua similaridade com células humanas, permitiu a criação de metodologias investigativas usadas em diversos estudos de potencial mutagênico de substâncias para uso humano. Entre essas se destacam nesse trabalho o SOS cromoteste, o Induteste, o Mutateste (Teste de Ames) e o teste com cepas *lacZ* revertentes (Teste de Miller). O objetivo principal desse trabalho foi de se caracterizar o potencial genotóxico e mutagênico de formulações de NP voltadas para uso neonatal, desdobrando-se em objetivos específicos, como o estudo das condições associadas e do mecanismo envolvido. O SOS cromoteste revelou o potencial genotóxico de diferentes formulações de NP e a importância de cada elemento para a observação desse caráter genotóxico. Pode-se destacar a importância dos aminoácidos na formulação de NP para a atividade genotóxica evidenciada no teste com a formulação completa (Aminoácidos, glicose, lipídeos, eletrólitos, vitaminas e elementos traço) variando na presença de vitaminas e elementos traço. O Induteste explorou, e confirmou, a variação desse caráter genotóxico de acordo com a temperatura de armazenamento, o tempo após o preparo e a exposição à luz. Tanto na presença de vitaminas, quanto na de elementos traço, as formulações e NP testadas apresentaram potencial genotóxico variando de acordo com a condição de armazenamento. A NP exposta à luz e em temperatura ambiente apresentou-se mais genotóxica. As NP testadas sob refrigeração tiveram diminuição significativa no caráter genotóxico apenas 48 horas após o preparo. O mecanismo mutagênico envolvido foi avaliado com o teste de Ames e o teste de Miller. O primeiro não apresentou resultados positivos, enquanto que o teste de Miller pôde revelar o mecanismo mutagênico, com possível geração de 8-oxoG. A conclusão desse trabalho é de que as NP testadas possuem capacidade mutagênica, mesmo em condições de armazenamento recomendadas, como refrigeração e fotoproteção, tendo como mecanismo evidente a presença de ERO e conseqüente oxidação genética. Este caráter mutagênico deve ser levado em consideração, incitando estudos abordando eucariotos e amostras de pacientes tratados, além de questionar efeitos genético-degenerativos de longo prazo em pacientes tratados no período neonatal.

ABSTRACT

DEODATO, Elder Luciano. Characterization of the genotoxic and mutagenic potential of 3:1 parenteral nutrition admixtures used in preterm neonates. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2009.

The Parenteral Nutrition (PN) is a way to deliver essential nutrients intravenously to the humans, when oral or enteral nutrition are not possible. It is characterized as a nutrient mixture in which diverse reactions can occur, placing at risk its physicochemical stability. Oxidation reactions in the PN are influenced by temperature, luminosity and their own constituents. In the presence of oxygen, reactive oxygen species (ROS) can be produced, which are able to damage genetic structures. In this case, preterm neonates, incapable of absorbing nutrients, due to their intestinal immaturity, are particularly sensitive, since they possess a fragile antioxidant defense system. The peroxide presence in the PN can be responsible for oxidative stress in treated preterm neonates, leading to hepatic dysfunction. This oxidative stress can generate oxidative damage in the DNA, forming 8-oxoguanine (8-oxoG) as major oxidized base product. This damage may cause mutations. The repair of oxidative injuries in human cells and bacteria, like *Escherichia coli*, occur in a very similar ways. In *E. coli*, a group of enzymes able to correct the base's mispairment caused by 8-oxoG, as the MutY, the MutM and the MutT, work in set to prevent mutation. This knowledge allowed the development of bacterial assays designed for mutagenic studies, which can be correlated to human risks, namely: SOS chromotest, Inductest, Mutatest (Ames test) and the reversion assay with *lacZ* strains (Miller test). Therefore, the general objective was to characterize the genotoxic and mutagenic potential of PN formulations used in preterm neonates, using these short-term bacterial assays. In this way, several parameters were evaluated: sample concentration, storage temperature, light exposure and preparation time of the formulation. The SOS chromotest revealed the genotoxic potential of different PN formulations and the relative importance of each PN constituent. The amino acids mix, isolated from whole PN, was able to induce genotoxicity. Inductest was used to evaluate the influence of storage temperature, time after the PN preparation and light exposure in PN genotoxicity. PN containing either vitamins or trace elements displayed genotoxic potential according to the varying storage conditions. The PN submitted light exposure and stocked at room temperature demonstrated genotoxicity. The PN tested under refrigeration had significant reduction in the genotoxic potential after 48-hour preparation. The mutagenic mechanism involved was evaluated with the Ames test and the Miller test. The first one was not conclusive, whereas the Miller test suggested an oxidized base profile, involving the generation 8-oxoG. The main conclusions of our work point that the tested PNs possess mutagenic potential, which could be determined in preconized storage conditions. In fact, genetic oxidation to DNA can be suggested, according to data obtained from the bacterial tests. This mutagenic potential must be taken in consideration, stirring up eukaryotic studies, especially those concerning genetic-degenerative effects of long term PN use in patients treated during the neonatal period.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Classificação nutricional do neonato. Adaptado de ASPEN, 2002 e FALCÃO, 2003.	12
Quadro 2	Guia para administração de macronutrientes em pacientes pediátricos. Adaptado de MARIAN, 1993.	13
Quadro 3	Recomendações diárias, a pacientes pediátricos, de macroelementos e microelementos segundo a idade e o peso (ASPEN, 2004).	13
Figura 1	Representação estrutural do pareamento entre as bases citosina e adenina com a base oxidada 8-oxoG.	30
Esquema 1	Mecanismo de dano oxidativo em DNA envolvendo a ação mutagênica da 8-oxoG e o mecanismo de reparo envolvido (MutT, MutM e MutY). As setas em vermelho indicam uma rota da mutação por oxidação envolvendo troca de bases, GC:TA. As setas em azul indicam ação de mecanismos de reparo de lesões oxidativas de DNA. As setas em verde indicam a via normal de duplicação de DNA com correto pareamento de bases. Adaptado de FORTINI <i>et al</i> , 2003; WALLACE, 2002; GAO <i>et al</i> , 2004; OLINSKI <i>et al</i> , 2003; SASAKI, 2006; e MICHAELS <i>et al</i> , 1992.	32
Figura 2	Controle positivo com 4-NQO, potente agente genotóxico/mutagênico. O DNA é tão danificado que provoca morte celular (halo de inibição de crescimento), apresentado pela ausência de coloração no centro do halo azul.	35
Figura 3	Resultado de indução lisogênica do Induteste com exposição ao Ultravioleta tipo C, controle positivo.	36
Figura 4	Controle positivo, versão “spot test” com 4-NQO, potente agente genotóxico/mutagênico. O DNA é tão danificado que provoca morte celular (halo de inibição de crescimento), apresentado pela ausência de colônias em seu interior e delimitado por colônias revertentes (His ⁻ → His ⁺).	37
Figura 5	Resultado de crescimento de bactérias revertentes (Lac ⁻ → Lac ⁺) por ação mutagênica.	39
Quadro 4	Composição das formulações base de NP usadas para avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade.	43
Quadro 5	Composição dos macronutrientes utilizados para o preparo das NP utilizadas neste trabalho.	44
Quadro 6	Relação de testes microbiológicos, cepas utilizadas, mecanismo, mutações específicas e resultado esperado.	47
Esquema 2	Fluxograma do desenvolvimento experimental deste trabalho.	48
Quadros 7A e 7B	Quadros 7A e 7B, representando os resultados obtidos no ensaio SOS cromoteste com a formulação contendo a exclusão de um item e o item excluído analisado separadamente, respectivamente. Os cálculos da composição foram feitos conforme indicado no Quadro 4, com peso para cálculo de 1,0 kg. O resultado da análise é representado pelos sinais + ou - para genotóxico ou não genotóxico, respectivamente. Os controles, positivo (UVC e 4NQO) e negativo (ÁGUA), são	60

	representados no Quadro 7B.	
Gráfico 1A	Resultado do Induteste para NPV nos diferentes tempos após preparo e condições de armazenamento. Os resultados individuais de fator de indução foram divididos pelo fator de indução do espontâneo, para melhor visualização. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p=0,0004$, resultado significativo tendo como referência $p<0,05$.	62
Gráfico 1B	Resultado do Induteste para NPO nos diferentes tempos após preparo e condições de armazenamento. Os resultados individuais de fator de indução foram divididos pelo fator de indução do espontâneo, para melhor visualização. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p<0,0001$, resultado significativo tendo como referência $p<0,05$.	64
Gráfico 2A	Resultado do Induteste para NPO nos diferentes tempos após preparo e armazenada sob refrigeração. Os resultados individuais de fator de indução foram divididos pelo fator de indução do espontâneo, para melhor visualização. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p<0,05$, resultado significativo.	65
Gráfico 2B	Resultado do Induteste para NPV nos diferentes tempos após preparo e armazenada sob refrigeração. Os resultados individuais de fator de indução foram divididos pelo fator de indução do espontâneo, para melhor visualização. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p<0,05$, resultado significativo.	66
Quadro 8	Resultado do teste de Ames, “spot test”, realizado com as amostras NPO e NPV, comparando os resultados com o controle positivo 4-NQO. A avaliação negativa revela que o composto em teste não apresenta caráter mutagênico pelo teste, nas condições de ensaio.	68
Gráficos 3A-F	Resultado do teste de Miller para NPV. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p<0,0001$, resultado significativo tendo como referência $p<0,05$.	69
Gráfico 3G	Resultado do título de células, após 24 horas de exposição às NP, das cepas CC101-106 para NPV.	70
Gráficos 3H-M	Resultado do teste de Miller para NPO. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p<0,0001$, resultado significativo tendo como referência $p<0,05$.	71
Gráfico 3N	Resultado do título de células, após 24 horas de exposição às NP, das cepas CC101-106 para NPO.	72
Gráficos 3O-T	Resultado do teste de Miller para NPS. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p<0,0001$, resultado significativo tendo como referência $p<0,05$.	73
Gráfico 3U	Resultado do título de células, após 24 horas de exposição às NP, das cepas CC101-106 para NPS.	74
Gráfico 4A	Resultado do Ensaio com cepa MutY para NPV nos diferentes tempos após preparo e concentrações de amostra. Os resultados individuais de fator de mutação da cepa CC104 foram multiplicados pelo fator de	75

	mutação da cepa CC104 <i>mutY</i> , para obter o fator de mutação oxidativa de DNA. O fator de mutação da amostra é dividido pelo fator de mutação espontâneo para melhor visualização dos resultados. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p < 0,0001$, resultado significativo tendo como referência $p < 0,05$.	
Gráfico 4B	Resultado do título de células, após 24 horas de exposição às NP, das cepas CC104 (wt) e CC104 <i>mutY</i> (mutY) para NPV nos diferentes tempos de preparo.	76
Gráfico 4C	Resultado do Ensaio com cepa MutY para NPO nos diferentes tempos após preparo e concentrações de amostra. Os resultados individuais de fator de mutação da cepa CC104 foram multiplicados pelo fator de mutação da cepa CC104 <i>mutY</i> , para obter o fator de mutação oxidativa de DNA. O fator de mutação da amostra é dividido pelo fator de mutação espontâneo para melhor visualização dos resultados. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p < 0,0001$, resultado significativo tendo como referência $p < 0,05$.	77
Gráfico 4D	Resultado do título de células, após 24 horas de exposição às NP, das cepas CC104 (wt) e CC104 <i>mutY</i> (mutY) para NPO nos diferentes tempos de preparo.	78
Esquema 3	Mecanismo de fixação da mutação AT→CG, tornando a cepa CC101 revertente para produção de β -galactosidase.	85
Esquema 4	Mecanismo de fixação das mutações AT→TA e AT→GC, tornando as cepas CC105 e CC106 revertentes para produção de β -galactosidase.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultado da Sobrevivência bacteriana no Induteste para NPV e NPO nas diferentes condições de armazenamento.	63
Tabela 2	Resultado da Sobrevivência bacteriana no Induteste para NPV e NPO no decorrer do tempo após o preparo.	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	TERAPIA NUTRICIONAL	1
1.2	NUTRIÇÃO PARENTERAL	2
1.2.1	História	2
1.2.2	Componentes	4
1.2.2.1	Proteínas	5
1.2.2.2	Carboidratos	6
1.2.2.3	Gorduras	6
1.2.2.4	Eletrólitos e minerais	8
1.2.2.5	Vitaminas	8
1.2.2.6	Oligoelementos	9
1.2.2.7	Contaminante: Alumínio	10
1.2.3	Manipulação de Nutrição Parenteral	10
1.3	PERFIL DO PACIENTE PEDIÁTRICO	11
1.4	COMPLICAÇÕES DA TNP	14
1.5	ESTABILIDADE E COMPATIBILIDADE NA NP	15
1.5.1	Peroxidação da NP	19
1.6	TOXICIDADE ASSOCIADA À PEROXIDAÇÃO DA NP	21
1.7	DANO GENÉTICO E MUTAGÊNESE	26
1.8	REPARO DE LESÕES OXIDATIVAS NO DNA	31
1.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DA NP	33
1.9.1	Avaliação de atividade genotóxica: <i>SOS cromoteste</i>	34

1.9.2	Avaliação de atividade genotóxica: <i>Induteste</i>	35
1.9.3	Avaliação de atividade mutagênica: <i>Mutateste</i>	36
1.9.4	Avaliação de mecanismo de mutagenicidade: <i>ensaio lacZ (Teste de Miller)</i>	38
1.9.5	Avaliação de mutagenicidade por dano oxidativo ao DNA: <i>Ensaio com cepa deficiente em MutY</i>	39
2	OBJETIVOS	40
2.1	OBJETIVO GERAL	40
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	AMOSTRAS	42
3.2	CONDIÇÕES DE ENSAIO	45
3.2.1	Tempo após o preparo da NP	45
3.2.2	Temperatura de armazenamento da NP	45
3.2.3	Fotoproteção da NP	46
3.2.4	Concentração da amostra	46
3.3	ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS	47
3.3.1	Material de laboratório	48
3.3.2	Soluções e meios de cultura	49
3.3.2.1	Meio LB	49
3.3.2.2	Meio LB _{sólido}	49
3.3.2.3	Meio M63	49
3.3.2.4	Meio Top Agar	50
3.3.2.5	Meio MMM-glicose	50

3.3.2.6	Meio MMM-lactose	51
3.3.2.7	Meio MEVB	51
3.3.2.8	Meio GS	52
3.3.2.9	Solução Mista	52
3.3.2.10	Solução tampão M9	52
3.3.3	Procedimentos técnicos	53
3.3.3.1	SOS cromoteste	53
3.3.3.2	Induteste	53
3.3.3.3	Ensaio com cepa <i>MutY</i>	55
3.3.3.4	Teste de Miller	56
3.3.3.5	Mutateste - “spot test”	57
3.4	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	58
4	RESULTADOS	59
4.1	SOS CROMOTESTE	59
4.2	INDUTESTE	61
4.3	TESTE DE AMES	67
4.4	TESTE DE MILLER	68
4.5	ENSAIO COM CEPA DEFICIENTE EM <i>mutY</i>	74
5	DISCUSSÃO	79
6	CONCLUSÃO	90
7	RECOMENDAÇÕES	92
8	PERSPECTIVAS	94
9	REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 TERAPIA NUTRICIONAL

Todo organismo vivo, a despeito da sua espécie ou complexidade, depende de obtenção de energia e substratos para a manutenção de seus processos metabólicos e funções vitais. Para atingir esse objetivo estes organismos deverão obter matéria-prima, tanto para gerar energia quanto para obter elementos necessários à preparação de novas estruturas, do meio ambiente em que vivem. Vegetais, fungos, bactérias, animais, precisam “alimentar-se” para obter essa matéria-prima. Os requerimentos nutricionais são definidos como a quantidade de energia e nutrientes, que são disponíveis em alimentos, que um indivíduo saudável poderia ingerir com o objetivo de satisfazer todas as funções normais de seu organismo (DELGADO *et al.*, 2000).

Do recém-nascido ao idoso, a nutrição via oral, com mastigação, motilidade, digestão, absorção e processamento dos nutrientes é a via fisiológica, ou natural, de obtenção dos macronutrientes (carboidratos, gorduras e proteínas) e micronutrientes (vitaminas e minerais) (WAITZBERG, 2004).

As diferentes condições fisiológicas e/ou mórbidas existentes na vida (crescimento, puberdade, gravidez, envelhecimento, doenças agudas ou crônico-degenerativas, etc.) constituem a base das variações das necessidades energético-nutricionais. A manutenção do estado nutricional adequado de cada indivíduo está ligada ao equilíbrio constante entre consumo e necessidade de nutrientes (WAITZBERG, 2004). A mal nutrição pode surgir como consequência do suprimento inadequado de nutrientes, perdas excessivas, ou significativo aumento nas necessidades metabólicas (DELGADO *et al.*, 2000).

Quando o organismo falha em obter nutrientes de forma natural, fisiológica, independentemente do ponto em que o processo falha, é que se faz necessário o início de uma

terapia nutricional, objetivando prevenir uma condição de mal nutrição e suas conseqüências (DELGADO *et al.*, 2000). Neste contexto, a terapia refere-se ao conjunto de procedimentos visando a reconstituir ou manter o estado nutricional de um indivíduo, por meio de oferta de alimentos ou nutrientes para fins especiais. Pode ser empregada por via digestiva, constituindo a Terapia Nutricional Enteral (TNE) ou por via venosa, Terapia Nutricional Parenteral (TNP) (WAITZBERG, 2004).

Em síntese, a TNP pode ser definida como a modalidade de terapia nutricional que promove a oferta de nutrição para necessidades metabólicas e de crescimento, através da rota parenteral, com uso de Nutrição Parenteral (NP) (CHAUDHARI e KADAM, 2006).

1.2 NUTRIÇÃO PARENTERAL

1.2.1 **História**

O início da história da infusão de nutrientes via parenteral ocorreu com a descoberta, por William Harvey (1628), da circulação sanguínea, resultando na base racional para todas as injeções e infusões intravenosas. Seguido a isso, em 1665, Sir Christopher Wren promoveu a infusão intravenosa de vinho em cães. O próximo passo seria a infusão de azeite de oliva em cães por William Courten (1712), causando a morte com sintomas de severo estresse respiratório. Mais adiante, em 1832, o escocês Latta promoveu a infusão de solução salina em pacientes com desidratação por diarreia causada por cólera, com resultados satisfatórios. Em 1873, a infusão de leite em 3 pacientes coléricos resultou na melhora súbita de dois deles e na morte do terceiro. Este último trabalho, publicado por Edward Hodder, foi importante, pois com a apresentação de diversas reações adversas ficou bem claro que não era possível a infusão intravenosa de gordura sem que houvesse modificações importantes. A infusão de glicose em humanos por Arthur Beidl e Rudely Krauts, no final do século XIX, deu início a uma nova era nutricional. A partir daí, os

eventos relacionados a descobertas no campo da infusão intravenosa de nutrientes ocorreram com maior frequência, culminando na inserção da TNP na prática clínica nos anos 60 do século XX (VINNARS e WILMORE, 2003).

No Brasil, findando os anos 60 do século passado, ocorreu a movimentação de profissionais da saúde para os Estados Unidos e Europa que buscavam aprender sobre esta nova técnica nutricional. Ocorreu que, em 1973, no Congresso de Cirurgia Clínica, sediado no município fluminense de Teresópolis, estes profissionais que estavam envolvidos com a novidade nutricional se uniram e, em 1974, fundaram a então Sociedade brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral (SBNPE). Esta, juntamente com a Sociedade Americana de Nutrição Parenteral e Enteral (ASPEN) e a Sociedade Européia de Nutrição Parenteral e Enteral (ESPEN), vem tendo forte influência na disseminação e padronização da TNP pelo Brasil, levando até à criação de regulamentos oficiais como a Resolução de Direção Colegiada nº 272 (RDC 272) (ANVISA-BRASIL, 1998), de 8 de abril de 1998 (WAITZBERG e CAMPOS, 2003).

A TNP é uma técnica de suporte nutricional que se tornou conhecida a partir de 1968 com um trabalho publicado por Dubrick *et al.* (DUBRICK *apud* WAITZBERG e CAMPOS, 2003), na qual se demonstrava a possibilidade de tratamento nutricional de um paciente por via venosa. Graças à pronta disponibilidade de muitos dos componentes da nutrição parenteral (Macronutrientes - soluções de aminoácidos, glicose e emulsões lipídicas; e Micronutrientes - eletrólitos, oligoelementos e vitaminas) e à facilidade da cateterização venosa central, a TNP foi amplamente difundida no mundo todo (WAITZBERG, 2004).

O uso desta modalidade de suporte nutricional, nos últimos 30 anos, tem sido responsável por considerável melhora no prognóstico de pacientes com falha gastrointestinal ou outras doenças (HONG *et al.*, 2007). Apesar da eficácia dessa terapia ser controversa em muitas

circunstâncias, é bem claro que a TNP é vital para pacientes incapazes de se alimentar ou absorver nutrientes por períodos prolongados (JONAS e ZIEGLER, 1998).

A TNP será sempre indicada quando o paciente estiver impossibilitado de usar a via enteral por um tempo predefinido (MARCHINI *et al.*, 1998). Em se tratando de pacientes pediátricos, as indicações para uso de TNP incluem malformações congênitas do trato gastrointestinal, enterocolite necrosante, síndrome do intestino curto, diarreia intratável, estados hipermetabólicos e prematuridade (MARIAN, 1993). A imaturidade funcional do estômago e a pequena capacidade gástrica de neonatos prematuros demandam o uso de NP para dar suporte ao crescimento normal, até que uma nutrição enteral possa ser estabelecida (KHASHU *et al.*, 2006).

Deste modo, a TNP é sempre necessária nos estágios iniciais de alimentação de neonatos prematuros de muito baixo peso (LABORIE *et al.*, 1998).

1.2.2 Componentes

Por definição, a nutrição parenteral é uma solução ou emulsão, composta basicamente de macronutrientes e micronutrientes, estéril e apirogênica, acondicionada em recipiente de vidro ou plástico, destinada à administração venosa em pacientes desnutridos ou não, em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, visando à síntese ou manutenção dos tecidos, órgãos ou sistemas (ANVISA-BRASIL, 1998).

A TNP é uma técnica médica utilizada mundialmente para prover nutrição àqueles cujo intestino é inapto a absorver nutrientes pela via oral normal. É infundido através de um cateter diretamente numa veia periférica ou profunda (ASPEN, 2002).

A nutrição intravenosa tem transformado o manejo de pacientes com síndrome de intestino curto, fístula enterocutânea, severa desnutrição e estados pós-operatórios complexos. As necessidades nutricionais do paciente ditam um balanço apropriado de carboidratos, lipídios, aminoácidos, eletrólitos, vitaminas, elementos traço e água. De um ponto de vista prático, o

menor risco de infecções, associado com mudanças de infusões menos freqüentes e a simplicidade de aplicação, faz da formulação três em um (3:1) a melhor escolha (KITCHEN e FORBES, 1999).

Sendo assim, a NP pode ser administrada como sistema “todos em um” (3:1) – Aminoácidos + Glicose + Lipídios, tendo como justificativa o fato de que reduzem o risco de infecções ou complicações metabólicas, erros de administração, e custos (DUPERTUIS *et al.*, 2002). O uso de formulações 3:1 em neonatos de alto risco pode ser unicamente benéfico, reduzindo, ou eliminando, a necessidade de separar a formulação e seus riscos associados (DRISCOLL *et al.*, 2003).

1.2.2.1 Proteínas

As proteínas são indispensáveis para o crescimento, embora sejam de pouca valia como fonte energética (FALCÃO, 2003).

Na Europa, o primeiro hidrolisado de proteína comercializado foi desenvolvido por Arvid Wretlind em 1944. Wretlind hidrolisava a caseína enzimaticamente e então dialisava o produto para obter grandes polipeptídeos. Como desvantagem, o triptofano, um aminoácido essencial, era destruído no processo de hidrólise. Apesar disso, as soluções continham todos os aminoácidos necessários para síntese protéica. Depois de muitos anos de ajustes nas formulações, surgiram as soluções de aminoácidos cristalinos, com similar atividade biológica. Nos anos 1970, os hidrolisados desapareceram do mercado (VINNARS e WILMORE, 2003).

As proteínas são fornecidas na forma de uma solução de aminoácidos cristalinos, que oferecem 4 kcal/g. Essas soluções, quando voltadas para neonatologia, contêm 9 aminoácidos essenciais além de cisteína, tirosina, taurina e arginina como aminoácidos semi-essenciais (CHAUDHARI e KADAM, 2006).

Para neonatos prematuros, uma formulação de aminoácidos contendo taurina é extremamente importante. A ausência deste aminoácido está associada a efeitos deletérios no desenvolvimento do cérebro e retina desses neonatos. A imaturidade renal pode contribuir para esses efeitos, pois leva à inabilidade de conservar taurina no organismo por incapacidade de reabsorção desse aminoácido nos néfrons (ZELICOVIC *et al.*, 1990). Além da necessidade, a inclusão desse aminoácido leva ao risco diminuído de colestase hepática associada ao uso de NP, corroborando a indicação de solução de aminoácidos contendo taurina para o neonato (SPENCER *et al.*, 2005).

1.2.2.2 Carboidratos

O carboidrato universalmente utilizado na NP é a glicose, embora o neonato prematuro apresente uma limitada capacidade de metabolizá-la (FALCÃO, 2003). Em comparação a crianças em maior idade, os neonatos possuem limitada resposta secretória de insulina à glicose administrada, levando a uma reduzida tolerância ao carboidrato (BOTTINO *et al.*, 2009). Apesar disso, seu uso é vantajoso para o neonato, pois ela é prontamente disponibilizada para o cérebro, fornecendo cerca de 4 kcal/g. Um neonato pré-termo, que pode ter hipotermia e estresse respiratório, tem alta demanda e a administração de glicose é vital (CHAUDHARI e KADAM, 2006).

Em 1915, Woodyatt e colaboradores publicaram estudos em infusão intravenosa de glicose em humanos. A infusão contínua foi avaliada pela primeira vez em 1924 por Matas, sendo reavaliada em 1945, com uso de cateter de veia cava superior por Zimmerman (ZIMMERMAN, 1945 *apud* VINNARS e WILMORE, 2003).

1.2.2.3 Gorduras

Os lipídios são as fontes calóricas de maior densidade, fornecendo cerca de 9 kcal/g. A grande vantagem da adição de gorduras na NP, principalmente no período neonatal, reside no

alto valor calórico associado à isotonicidade, facilitando sua administração por veias periféricas (FALCÃO, 2003).

Por volta dos anos 60, uma emulsão lipídica foi comercializada e levou à observação de diversos efeitos adversos, o que levou à sua retirada do mercado. Depois de muitos anos de tentativas e erros, Wretlind criou uma emulsão lipídica, preparada com óleo de soja e fosfolipídios de ovo, que poderia ser infundida com segurança no paciente. A emulsão lipídica atualmente recomendada para uso apresenta uma variação entre ácidos graxos tipo ω -3 e ω -6 em uma mistura de triglicerídeos de cadeia média (TCM) e triglicerídeos de cadeia longa (TCL) (VINNARS e WILMORE, 2003).

Os triglicerídeos em NP são emulsificados por fosfolipídios. Emulsões lipídicas são inerentemente termodinamicamente instáveis e os pequenos glóbulos lipídicos eventualmente coalescem formando duas fases na emulsão. Esse processo é retardado e a emulsão é estabilizada pela adição de lecitinas. Elas contêm fosfolipídios, com uma parte hidrofóbica e uma parte hidrofílica (KITCHEN e FORBES, 2000).

Essas emulsões são estéreis e apirogênicas. Triglicerídeos de cadeia média são sempre dados em associação com triglicerídeos de cadeia longa (TCL) como uma mistura física 1:1, com o objetivo de prover ácidos graxos de cadeia longa essenciais e reduzir efeitos adversos como acidose metabólica e toxicidade neurológica causada pelos altos níveis de ácidos graxos de cadeia média (KRUI MEL *et al.*, 2000).

Alta densidade energética e baixa osmolaridade de emulsões lipídicas injetáveis contribuem para seu atual uso como principal fonte energética em pacientes necessitando de NP (ANTÉBI *et al.*, 2004).

Os resultados do trabalho de Nishimura e colaboradores (NISHIMURA *et al.*, 2005) ressaltam a importância do uso de uma formulação de NP, apropriada para neonatos, contendo lipídios com o objetivo de evitar disfunção hepática e distúrbio de crescimento.

A maioria das emulsões lipídicas comerciais é feita à base de óleo de soja e contém o α -tocoferol, ou vitamina E, um componente natural. Existe aumento na prevenção de peroxidação lipídica dos ácidos graxos polinsaturados quando há suplementação com vitamina E, que funciona como antioxidante em emulsões lipídicas (STEGER e MUHLEBACH, 1998).

A adição de emulsão lipídica baseada em óleo de soja à NP mostrou um dramático efeito na prevenção dos efeitos adversos observados, como disfunção hepática e esteatose/colestase induzidas por overdose lipídica, em camundongos neonatos que recebiam NP sem lipídios (NISHIMURA *et al.*, 2005).

1.2.2.4 Eletrólitos e minerais

As necessidades eletrolíticas variam com a condição clínica do neonato, sendo dependentes de vários fatores, como a função renal, o estado de hidratação e o uso de diuréticos. Os elementos mais importantes são o sódio, o potássio, o cloro, o acetato, o cálcio, o fósforo e o magnésio. A relação entre cálcio e fósforo passa por interações que findam na precipitação e desestabilização da NP que contenha a mistura de gluconato de cálcio e fosfato ácido de potássio. Para evitar essa interação é comercializada atualmente a forma orgânica de fosfato, evitando-se assim a ocorrência de precipitados de eletrólitos na NP preparada que contenha esses dois eletrólitos (FALCÃO, 2003).

1.2.2.5 Vitaminas

As vitaminas são fornecidas em soluções multivitamínicas, que são adicionadas à solução parenteral. As vitaminas hidrossolúveis compreendem vitamina C e as do complexo B, enquanto que as lipossolúveis compreendem as vitaminas A, D, E e K (FALCÃO, 2003).

Polissorbatos são tensoativos adicionados à formulação de multivitamínicos para dissolver vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis no mesmo meio (LABORIE *et al.*, 1998). A oferta de vitaminas na NP é de especial importância para o organismo devido à sua atividade antioxidante. A vitamina E é especialmente recomendada por promover a diminuição de alterações oxidativas que possam ocorrer nas emulsões lipídicas (VINNARS e WILMORE, 2003).

A vitamina E é considerada como o antioxidante de membrana mais usado pela célula e a maior atividade antioxidante é a proteção contra a peroxidação lipídica. O ácido ascórbico, ou vitamina C, é considerado o maior antioxidante de fase aquosa. Evidências sugerem que a vitamina E e a vitamina C atuam juntas numa reação cíclica. Durante esse processo, a vitamina E é convertida em um radical por doar um hidrogênio para um lipídio ou radical peroxil lipídico. A vitamina E oxidada é energeticamente estável, tem baixa reatividade com outras moléculas da membrana e pode, então, ser reduzida à sua forma original pela vitamina C (VALKO *et al.*, 2004).

A maioria das soluções multivitamínicas possui 5'-fosfato flavina mononucleotídeo como fonte de riboflavina, uma vitamina implicada em um grande número de vias metabólicas, incluindo reações de cadeia respiratória (LABORIE *et al.*, 1998).

1.2.2.6 Oligoelementos

Elementos traço, ou oligoelementos, como zinco, cobre, manganês, selênio, flúor e iodo, estão presentes em soluções comerciais em diferentes concentrações (FALCÃO, 2003). Necessários para a função normal de uma série de enzimas críticas, são rotineiramente adicionados à NP (KITCHEN e FORBES, 2000).

Metais traço, como cobalto, cobre e ferro, são microelementos essenciais com múltiplas funções fisiológicas (BAL e KASPRZAK, 2002). O cobre é um componente essencial de várias enzimas antioxidantes endógenas. Testes *in vitro* e *in vivo* mostram que o cobre não é

carcinogênico. Porém, testes *in vivo* têm mostrado que células de tumores têm alta concentração de cobre em seu microambiente. O cromo é um elemento traço essencial que tem importante função na regulação sanguínea dos níveis de glicose (VALKO *et al.*, 2006).

1.2.2.7 Contaminante: Alumínio

Estudos têm mostrado que o alumínio é encontrado em praticamente todos os produtos para NP, formulações de aminoácidos, glicose e lipídios. Alumínio também está presente em concentrados salinos como cloreto de potássio e cloreto de sódio. O limite estipulado pela ASPEN é de 25 µg/L (BOHRER *et al.*, 2002).

1.2.3 Manipulação de Nutrição Parenteral

Segundo a Farmacopéia Americana (USP 31, 2008), capítulo 797, todas as preparações estéreis, como a NP, devem ser feitas em um plano de sala limpa bem definido, onde a manipulação ocorra dentro de uma capela de fluxo laminar (horizontal ou vertical) classificação ISO 5, tendo área limpa adjacente classificação ISO 7 (DRISCOLL, 2005).

Uma NP é classificada segundo a Farmacopéia Americana (USP 31, 2008) como produto estéril, nível de risco médio. Este nível corresponde à probabilidade de contaminação da NP, podendo ser microbiológica e/ou físico-química. Esses dois fatores críticos estabelecem a validade na NP manipulada (ASPEN, 2004). As misturas de NP são instáveis físico-quimicamente e não podem ser estocadas por muito tempo. Ácido ascórbico é degradado através de oxidação catalisada por íons metálicos, tiamina através de redução por metabisulfito, e vitaminas A e E, principalmente através de fotodegradação. A reduzida capacidade de infusão de aminoácidos e seu reduzido pH, a luz, a temperatura de estoque e as quantidades de cálcio, fosfato e magnésio, todos afetam a estabilidade de vitaminas, sendo o maior responsável o

oxigênio. Bolsas multilaminadas são menos permeáveis ao oxigênio que bolsas tipo EVA (DUPERTUIS *et al.*, 2002).

Em quase todas as circunstâncias, a vitamina mais instável é a vitamina C. Ela é oxidada em uma reação reversível catalisada pelos elementos traço, particularmente cobre. A hidrólise do seu produto de degradação leva à formação de ácido oxálico (KITCHEN e FORBES, 2000). Isso baseia a recomendação para a infusão separada de vitaminas e elementos traço (ASPEN, 2004).

A RDC 272 (ANVISA-BRASIL, 1998), legislação brasileira que define parâmetros de qualidade para a execução de todos os processos envolvendo a NP, desde a manipulação à administração no paciente, estabelece que a produção da NP ocorra sob rigorosas condições de assepsia, levando em consideração constante controle microbiológico ambiental e da própria NP, devendo ser armazenada e transportada sob refrigeração (2 a 8 °C) com prazo de validade estabelecido de 48 horas.

1.3 PERFIL DO PACIENTE PEDIÁTRICO

Pacientes pediátricos possuem muitas particularidades que tornam a TNP aplicada muito diferente em relação à que é aplicada ao paciente adulto. Estes requerem demanda aumentada de nutrientes, o que pode causar estresse metabólico (MARIAN, 1993).

O volume hídrico de manutenção de uma criança prematura é especialmente sensível a variações: sua delicada epiderme, sua grande superfície corporal, relativa ao peso e a pequena quantidade de gordura favorecem as perdas hídricas (inclusive pela pele e pelo trato respiratório), acrescentando-se a isso o uso de incubadoras e fototerapia, tão necessárias nessa fase da vida (MARCHINI *et al.*, 1998). Além disso, os pré-termos possuem função renal relativamente limitada e não toleram muito bem a excessiva infusão hídrica (ROSE *et al.*, 1993).

O paciente pré-termo (idade gestacional < 38 semanas) e de muito baixo peso (< 1,5 kg) (ASPEN, 2004) faz uso inicialmente de NP com o objetivo de prevenir o catabolismo tecidual e manter o balanço hídrico e eletrolítico (ROSE *et al.*, 1993). A seguir, apresenta-se a classificação nutricional do neonato (Quadro 1).

Quadro 1: Classificação nutricional do neonato. Adaptado de ASPEN, 2002 e FALCÃO, 2003.

Classificação por peso	
<i>Peso de nascimento (PN)</i>	<i>Nomenclatura</i>
PN < 2,5 kg	Neonato de baixo peso
PN < 1,5 kg	Neonato de muito baixo peso
PN < 1,0 kg	Neonato de extremo baixo peso
Classificação por idade gestacional	
<i>Tempo de gestação (TG)</i>	<i>Nomenclatura</i>
TG < 38 semanas	Neonato pré-termo
38 < TG < 42 semanas	Neonato termo
TG > 42 semanas	Neonato pós-termo
Classificação por PN e TG	
<i>Percentil (PN/TG)</i>	<i>Nomenclatura</i>
Abaixo do 10º percentil	Pequeno para a idade gestacional (PIG)
Entre o 10º percentil e o 90º percentil	Adequado para a idade gestacional (AIG)
Acima do 90º percentil	Grande para a idade gestacional (GIG)

A NP, incorporando proteínas, carboidratos e emulsão lipídica, poderia ser iniciada tão logo clinicamente possível, preferencialmente no primeiro dia de vida, para prevenir um estado de desnutrição aguda, normalizar os níveis séricos de glicose e melhorar o balanço protéico (ASPEN, 2002).

A formulação e elaboração de uma NP adequada para crianças requer a manipulação de muitos parâmetros, a realização de complicados cálculos matemáticos e repetidos e individualizados ajustes dos constituintes finais (SANGRADOR *et al.*, 1995).

Segue no Quadro 2 o guia para administração de macronutrientes na NP em pacientes pediátricos.

Quadro 2: Guia para administração de macronutrientes em pacientes pediátricos. Adaptado de MARIAN, 1993.

Macronutrientes	Etapas	Prematuros	Crianças	Adolescentes
Glicose	Início	5 g/kg/dia	5-10%/dia	10%/dia
	Avanço	2,5%/dia	5%/dia	5-10%/dia
	Máximo	14 mg/kg/min	20 mg/kg/min	5 mg/kg/min
Proteínas	Início	0,25 g/kg/dia	0,5-1,0 g/kg/dia	1,0 g/kg/dia
	Avanço	0,5 g/kg/dia	0,5-1,0 g/kg/dia	1,0 g/kg/dia
	Máximo	2,3-3,5 g/kg/dia	-	-
Lipídios	Início	0,25 g/kg/dia	0,5-1,0 g/kg/dia	-
	Avanço	0,5 g/kg/dia	0,5-1,0 g/kg/dia	-
	Máximo	2,3-3,5 g/kg/dia	-	-

A ASPEN publica periodicamente guias para a prática segura de TNP. Nestes ficam definidas as recomendações diárias (Quadro 3) para NP em pediatria.

Quadro 3: Recomendações nutricionais diárias, a pacientes pediátricos segundo a idade e o peso (ASPEN, 2004).

Macronutrientes	Pré-termos	Infantes	Crianças	Adolescentes
Proteínas (g/kg)	3 – 4	2 – 3	1 – 2	0,8 – 1,5
Calorias (kcal/kg)	90 – 120	80 – 105	50 – 90	30 – 50
Eletrólitos	Pré-termos	Infantes/Crianças		Adolescentes
Sódio	2 – 5 mEq/kg	2 – 5 mEq/kg		1 – 2 mEq/kg
Potássio	2 – 4 mEq/kg	2 – 4 mEq/kg		1 – 2 mEq/kg
Cálcio	2 – 4 mEq/kg	0,5 – 4 mEq/kg		10 – 20 mEq
Fósforo	1 – 2 mmol/kg	0,5 – 2 mmol/kg		10 – 40 mmol
Magnésio	0,3 – 0,5 mEq/kg	0,3 – 0,5 mEq/kg		10 – 30 mEq
Vitaminas (5 mL)	paciente < 1 kg *	paciente de 1 – 3 kg *		paciente > 3 kg *
Vit. A – 2300 UI	1,5 mL	3,25 mL		5 mL
Vit. D – 400 UI				
Vit. E – 7 UI				
Vit. K – 200 µg				
Vit. C – 80 mg				
Vit. B ₁ – 1,2 mg				
Vit. B ₂ – 1,4 mg				
Vit. B ₃ – 17 mg				
Vit. B ₅ – 5 mg				
Vit. B ₆ – 1 mg				
Vit. B ₁₂ – 1 µg				
Biotina – 20 µg				
Folato – 140 µg				
Oligoelementos				
Zinco	400 µg /kg	50 – 250 µg /kg	50 – 125 µg /kg	2 – 5 mg
Cobre	20 µg /kg	20 µg /kg	5 – 20 µg /kg	200 – 500 µg
Manganês	1 µg /kg	1 µg /kg	1 µg /kg	40 – 100 µg
Cromo	0,05 – 0,2 µg /kg	0,2 µg /kg	0,14 – 0,2 µg /kg	5 – 15 µg
Selênio	1,5 – 2 µg/kg	2 µg/kg	1 – 2 µg/kg	40 – 60 µg

* Valores baseados apenas no peso do paciente, independente da sua idade.

1.4 COMPLICAÇÕES DA TNP

A infusão contínua de nutrientes durante 24 horas impõe mudanças importantes no centro hormonal. O homem é um animal que se alimenta por meio de refeições e, de forma fisiológica, alterna períodos prandiais com períodos pós-absortivos (WAITZBERG, 2004).

Vale ressaltar que a NP é uma mistura concentrada de nutrientes que é administrada diretamente no sistema venoso do paciente. Complicações mecânicas, infecciosas e metabólicas podem ocorrer quando iniciada e fornecida a NP (MARIAN, 1993).

Neonatos prematuros perdem sódio na urina por causa da imaturidade da capacidade de reabsorção de sódio pelos rins e com terapia diurética, resultando em hiponatremia e retenção hídrica. Possuem aumentado risco de hiperglicemia por saturação dos receptores de insulina ou imaturidade da resposta hepática e pancreática. A hiperglicemia pode também ser resultado de sepse, cirurgia, ou estresse respiratório. Hipertrigliceridemia é comum devido ao reduzido *clearance* de lipídios por causa da limitada atividade da lipoproteína lipase (ASPEN, 2002). A colestase associada a NP é a complicação mais comum da TNP em neonatos. Com a TNP sendo de longa duração, os níveis de bilirrubina direta aumentam e mudanças microscópicas degenerativas tornam-se mais significantes (CAI *et al.*, 2006).

A disfunção hepática é a maior complicação decorrente do uso da NP em neonatos por longo tempo. O estresse oxidativo tem importante papel na disfunção hepática associada a NP (HONG *et al.*, 2007).

Há relatos documentados de doença óssea em adultos e crianças que receberam TNP por tempo prolongado, com desenvolvimento de fraturas patológicas. Os pacientes eram hipercalcêmicos e intermitentemente apresentavam moderada hipercalcemia e hiperfosfatemia. Foi subsequente encontrado que esses pacientes receberam inadvertidamente grandes quantidades de alumínio presentes na NP. Os efeitos deletérios do alumínio na formação óssea

podem ocorrer como conseqüência da deposição superficial de alumínio no osso, levando a uma reduzida reabsorção óssea de cálcio (VARGAS *et al.*, 1988).

O impacto imunológico das dietas parenterais é particularmente importante porque a terapia é normalmente administrada em pacientes críticos. O aumento do risco de infecções em pacientes em nutrição parenteral tem sido associado aos efeitos imunossupressores dos componentes lipídicos da dieta. Em neonatos prematuros os lipídios têm importante contribuição para o desenvolvimento de infecções. Além disso, os lipídios levam ao decréscimo da proliferação de linfócitos e induzem morte de linfócitos e neutrófilos via apoptose. Isto pode debilitar a função imune de leucócitos e assim comprometer o sistema de defesa (CURY-BOAVENTURA *et al.*, 2006).

Com o aperfeiçoamento da técnica de preparo e o desenvolvimento de soluções consistindo de uma combinação otimizada de nutrientes necessários, a incidência e severidade de complicações hepáticas têm diminuído, mas ainda continuam sendo a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes sob TNP por longo tempo (CAI *et al.*, 2006).

1.5 ESTABILIDADE E COMPATIBILIDADE NA NP

Para fins de definição, problemas de estabilidade aplicam-se à deterioração ou degradação de um princípio ativo ou sistema que altera sua ação farmacológica ou características farmacêuticas originais. Instabilidade pode levar a falhas terapêuticas ou à destruição da formulação, como a coalescência da emulsão lipídica. Em contraste, incompatibilidade geralmente envolve quebra da coexistência harmônica entre duas ou mais entidades, como dois eletrólitos numa solução (cálcio e fosfato). Uma incompatibilidade pode levar à precipitação de um produto insolúvel, como fosfato de cálcio dibásico (DRISCOLL, 2005).

A estabilidade da NP depende de fatores externos e internos. Fatores internos são os oligoelementos, íons divalentes, vitaminas, pH, lipídios e peróxidos. Fatores externos são temperatura ambiente, tipos de bolsas, oxigênio e exposição à luz, que podem resultar em coalescência e produção de peróxido (LEE *et al.*, 2003).

Sistemas de mistura de NP contendo lipídios, aminoácidos, glicose, eletrólitos, vitaminas e elementos traço, possuem limitada estabilidade dependendo da sua composição. Essas formulações 3:1 de NP têm um alto potencial para interações físico-químicas, além de serem misturas quimicamente instáveis com muitas reações possíveis ocorrendo, levando à instabilidade e incompatibilidades, que podem causar vários problemas quando administradas em pacientes (STEGGER e MUHLEBACH, 1998). Os exemplos mais importantes de reações químicas incluem oxidação de ácido ascórbico, redução de tiamina, fotodegradação de vitamina A e de determinados aminoácidos. A principal causa de perda de ácido ascórbico em misturas de NP é a reação com oxigênio. Ele tem origem em determinados componentes, como a glicose, bem como no processo de manipulação ou da permeabilidade de bolsas de NP, levando à dissolução de oxigênio na mistura. O oxigênio reage com ácido ascórbico catalisado pelos elementos traço, em particular o cobre (GIBBONS *et al.*, 2001). Ainda, a tiamina é degradada por soluções de aminoácido contendo metabissulfito (KITCHEN e FORBES, 2000).

A nutrição parenteral destinada a pacientes muito jovens (como neonatos no seu primeiro ano de vida) tem uma composição final muito diferente se comparada com aquela voltada para crianças mais velhas e adultos. Como exemplo, comparado com adultos, a composição dos aminoácidos tem maior concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), além do aminoácido taurina. Conseqüentemente, as soluções de aminoácidos pediátricos são mais ácidas que as soluções de aminoácidos para adultos, podendo influenciar no pH final da mistura de NP. Em adição, por causa da necessidade calórica

aumentada em neonatos, as proporções da formulação 3:1 são diferentes das dos adultos. As proporções de carboidratos e lipídios são similares entre as formulações para neonatos e adultos, porém, a proporção de aminoácidos para neonatos é bem menor. Para pacientes neonatos a necessidade de eletrólitos é bem aumentada, levando a um pH menor, com baixa concentração de aminoácidos e alta concentração de cálcio, se comparado com a formulação voltada para adultos. Isso leva a uma formulação 3:1 menos estável (DRISCOLL *et al.*, 2003).

A Farmacopéia Americana (USP 31, 2008), capítulo 729 e em sua monografia, deixa claro quais são as características físico-químicas desejáveis de emulsões lipídicas injetáveis para os padrões farmacopéicos. A desestabilização dessas emulsões via coalescência é o inevitável destino dessas formas termodinamicamente instáveis (DRISCOLL, 2006). Essa estabilidade pode ser afetada pelo pH da solução e a concentração de glicose e eletrólitos (especialmente cátions divalentes) (KITCHEN e FORBES, 2000). A adição de íons, variação de pH e também as composições de lipídios e de aminoácidos influenciam a estabilidade das misturas de NP. A reduzida estabilidade é indicada por um baixo potencial zeta, que é um parâmetro padrão usado para medir a repulsão eletrostática que previne a agregação e coalescência dos glóbulos lipídicos (DESPOIT *et al.*, 1997). Um efeito protetor tem sido atribuído aos aminoácidos. Eles podem interagir com o cálcio livre, reduzindo sua interação com o filme emulsificante. Eletrólitos equilibram o potencial zeta e subsequentemente estabilizam a repulsão eletrostática (MULLER e HEINEMANN, 1994).

A estabilidade das vitaminas na NP é afetada pelo pH da solução, os constituintes da fonte de aminoácidos (particularmente a presença ou ausência de cisteína), o potencial redox, oxigênio dissolvido, elementos traço, e exposição à luz ambiente (KITCHEN e FORBES, 2000). A fotoexposição da NP leva à degradação de vitaminas como o retinol, vitamina E, vitamina K e riboflavina. Essas fotoreações são resultado de exposição à luz ultravioleta (ALLWOOD e

MARTIN, 2000). Um problema relacionado com preparações contendo vitamina C e riboflavina é que esta promove a oxidação da vitamina C pelo oxigênio para gerar peróxido de hidrogênio. A oxidação do ácido ascórbico fotodependente em NP é catalisada por riboflavina e o mecanismo é bem estabelecido. É iniciado pela fotoexcitação da riboflavina que, na presença de um agente redutor como o ascorbato, gera radicais riboflavina e ascorbil. Esse radical então reage com oxigênio para gerar um ânion superóxido, que formará peróxido de hidrogênio. Esta seqüência de reação é acompanhada de outras que levam à degradação da riboflavina fotoexcitada. Quando o oxigênio é limitado, menos ascorbato é oxidado, mas a degradação de riboflavina ainda ocorre. Isso explica a importância da fotoproteção da NP contendo vitaminas. Além disso, a fotoproteção de NP tem mostrado que, *in vitro*, diminui a peroxidação lipídica, a perda de vitaminas e a oxidação de aminoácidos e, *in vivo*, previne danos pulmonares e esteatose hepática (KHASHU *et al.*, 2006). Para diminuir a perda de vitaminas há, também, a recomendação de adição de emulsão lipídica à NP (SILVERS *et al.*, 2001a). De qualquer modo, todas as infusões de NP devem ser protegidas da luz durante a administração, já que os lipídios oferecem apenas proteção marginal. O uso de bolsas multilaminadas oferece maior proteção à vitamina E, comparado com bolsas tipo EVA, porque são menos permeáveis a oxigênio (ALLWOOD e MARTIN, 2000).

Ainda, baixas condições de temperatura (2-8°C) significativamente prolongam a estabilidade de misturas contendo lipídios. Isso pode ser previsto pela aplicação da equação de Arrhenius, que relaciona temperatura com taxa de degradação. Assim, pode ser deduzido dessa equação que a cada 10°C aumentados na temperatura, existe um correspondente duplo, ou triplo aumento na taxa de degradação. De fato, o modelo de Arrhenius é usado para estimar a meia vida de drogas. Portanto, uma diferença de aproximadamente 20°C na temperatura entre refrigeração e temperatura ambiente (25°C) é significativa. Em essência, a refrigeração prolonga o inevitável processo de desestabilização, que é uma consequência de misturas 3:1 onde coalescência e

separação de fases são esperadas, num processo que ocorre em maior velocidade em temperatura ambiente (DRISCOLL *et al.*, 2001).

1.5.1 Peroxidação da NP

Fotoexposição, aminoácidos, lipídios, vitaminas, elementos traço, e aditivos são alguns dos diferentes elementos que promovem peroxidação em NP (LAVOIE e CHESSEX, 1997). A peroxidação lipídica ocorre na presença de oxigênio atmosférico. Isto é influenciado pela própria emulsão lipídica, condições de armazenamento (luz e temperatura), e propriedades materiais da bolsa de NP (STEGER e MUHLEBACH, 1998). Peroxidação em misturas 3:1 tem sido identificada como um risco potencial, particularmente se a mistura for exposta à luz (ALLWOOD, 2002). Emulsões lipídicas utilizadas para NP são prontamente peroxidadas sob condições de rotina clínica em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTI NEO). Este efeito é muito maior se a NP for exposta à luz utilizada para fototerapia de neonatos prematuros (SILVERS *et al.*, 2001a).

A infusão de peróxidos através da NP é potencialmente danosa à saúde de neonatos prematuros. Isso pode estar ligado a efeitos adversos que parecem estar associados com fototerapia. Emulsões lipídicas freqüentemente contêm peróxidos lipídicos, produzidos quando há incidência de luz ambiente ou de fototerapia. A adição de vitaminas à NP diminui a peroxidação induzida por luz (SILVERS *et al.*, 2001b).

O processo de peroxidação lipídica tem início com a abstração de um átomo alílico de hidrogênio para formar um radical pentadienila. O oxigênio molecular rapidamente é adicionado a esse radical e, então, é formado um conjugado dieno com um radical peroxila que irá gerar hidroperóxido pela abstração do átomo de hidrogênio, ou pela oxidação para formar outros produtos altamente oxidados, como endoperóxidos bicíclicos, peróxidos monocíclicos, peróxidos policíclicos e outros peróxidos complexos. A maioria desses peróxidos é instável e rapidamente

se decompõe levando a diversos produtos, como aldeídos reativos, alcanos (pentano), isoprostanos e outros compostos (YIN e PORTER, 2003).

A propriedade antioxidante do ácido ascórbico reside na sua habilidade de perder 2 elétrons, gerando desidroascorbato em uma reação reversível (KNAFO *et al.*, 2005). Riboflavina e polissorbato são moléculas fotossensíveis que poderiam estar relacionadas com a geração de peróxidos por fotoindução (LABORIE *et al.*, 1998). Em NP contendo vitaminas, a riboflavina fotoexcitada catalisa a transferência de elétrons de um doador, como o ácido ascórbico, para o oxigênio, levando à formação de peróxido de hidrogênio (KNAFO *et al.*, 2005).

A geração de peróxidos está associada com alteração dos nutrientes a serem infundidos. Em trabalho realizado por Laborie e colaboradores (LABORIE *et al.*, 1998) os resultados sugerem que a riboflavina pode reagir com outros doadores de elétrons além do ácido ascórbico, como aminoácidos ou lipídios. Aminoácidos como tirosina, metionina, prolina e triptofano podem ser oxidados na presença de riboflavina, gerando fotoprodutos tóxicos em modelos animais. A oxidação de aminoácidos leva a menores concentrações de peróxidos encontradas numa mistura de aminoácidos e glicose, quando comparados com glicose apenas.

Metais como o cobre e o ferro, na sua forma fisiológica são, predominantemente, elétron-reagentes. O cobre é um pró-oxidante e pode participar da peroxidação lipídica catalisada por metais (VALKO *et al.*, 2006). O mecanismo geral de ativação de oxigênio por íons metálicos é baseado na reação de Fenton/Haber-Weiss e reações de auto-oxidação, nas quais o oxigênio molecular e suas formas parcialmente reduzidas superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) servem como substratos. A conversão de H_2O_2 em radical hidroxila (OH^{\cdot}) ocorre pela oxidação de um cátion metálico (o metal serve como um agente redutor) na reação de Fenton. O ciclo redox do cátion metálico é mantido pela redução com $O_2^{\cdot-}$. O balanço das duas reações é a reação de Haber-Weiss. A forma oxidada do metal também pode originar uma auto-oxidação na

presença de oxigênio molecular, gerando H_2O_2 . É bem estabelecido que a reação de cobre, Cu(I), em meio aquoso com H_2O_2 forma espécies reativas de oxigênio (ERO) (BAL e KASPRZAK, 2002).

Assim como ocorre com o cobre, o radical superóxido pode reduzir o cromo(VI) a cromo(V) (reação tipo Fenton), que pode então catalisar a decomposição de H_2O_2 criando um radical $OH\cdot$. O cromo(V) pode ser reduzido pelos redutores celulares (ascorbato ou glutathione peroxidase) a cromo(VI), novamente participando da reação de Fenton para gerar o radical hidroxila (VALKO *et al.*, 2006).

1.6 TOXICIDADE ASSOCIADA À PEROXIDAÇÃO DA NP

A mistura de soluções de aminoácidos, lipídios, vitaminas, ou aditivos causa a geração de peróxidos. Peróxido de hidrogênio representa mais de 80% dos peróxidos gerados em multivitaminas, e peróxidos orgânicos também são contaminantes da NP. Os peróxidos infundidos podem causar um estresse oxidativo por si, ou podem ser convertidos a radicais livres na presença de oligoelementos (CHESSEX *et al.*, 2001a). A administração de NP em neonatos prematuros está associada ao aumento na atividade de radicais livre. Porém, o uso de lipídios, com redução da razão lipídios/glicose na NP, leva à diminuição na produção de ERO (BASU *et al.*, 1999).

Peróxidos lipídicos são espécies lábeis que podem se decompor enzimaticamente ou não-enzimaticamente produzindo, entre outros, malondialdeído e hidrocarbonetos voláteis. Em neonatos prematuros recebendo infusão intravenosa de emulsão lipídica, uma fração do aumento observado de pentano da respiração é derivada da emulsão lipídica. O grau de peroxidação lipídica da NP está relacionado com a temperatura e as condições de exposição à luz, a

composição material das bolsas e a quantidade de ácidos graxos polinsaturados da emulsão lipídica (PIRONI *et al.*, 2003).

Doença hepatobiliar progressiva é, potencialmente, uma complicação em pacientes recebendo NP por longo tempo, especialmente nos neonatos. Uma combinação de estresse oxidativo e depleção de glutathiona poderia ser um importante fator na patogênese de dano hepático induzido por NP (HONG *et al.*, 2007).

Infusões lipídicas podem levar à produção de peróxidos quando da exposição à luz, por causa da ação dos ácidos graxos polinsaturados como doadores de elétrons. Este processo é acentuado pelas preparações contendo multivitaminas e aminoácidos, levando à produção secundária de radicais livres com potencial dano tecidual e celular (KITCHEN e FORBES, 2000). Diversas evidências mostram que produtos de peroxidação lipídica afetam direta e indiretamente muitas funções celulares e homeostase de órgãos. Estes podem induzir uma resposta imune, iniciando fibrose ou inflamação, inativar enzimas contendo tiol, ou iniciar transcrição genética ou apoptose. Esses produtos estão ligados a várias doenças, como aterosclerose, câncer e desordens neurodegenerativas (YIN e PORTER, 2003). O dano oxidativo tecidual contribui para processo de doença aguda e crônica em muitos pacientes recebendo NP (JONAS e ZIEGLER, 1998).

Ainda, peróxidos lipídicos e produtos secundários à peroxidação podem ser diretamente citotóxicos e podem também ter efeitos indesejáveis como aumento da resistência vascular pulmonar. Isso pode estar relacionado com interferência na atividade de eicosanoides vasoreguladores ou interação com fator relaxante de endotélio (SILVERS *et al.*, 2001a). De fato, a infusão de emulsões lipídicas resulta em alteração do tônus vasomotor. Isto está ligado à geração de espécies oxidadas vasoconstritoras, como peróxidos lipídicos, que podem afetar o fluxo sanguíneo. Hidroxinonal, um produto final de peroxidação lipídica, diminui a produção

endógena de óxido nítrico e leva à vasoconstrição (KHASHU *et al.*, 2006). Além disso, os hidroperóxidos lipídicos modulam as atividades de cicloxigenase e lipoxigenase, responsáveis pela biossíntese de importantes prostaglandinas vasoreguladoras (NEUZIL *et al.*, 1995).

Existem vários mecanismos pelos quais os peróxidos lipídicos poderiam causar dano pulmonar: (1) produtos de quebra aldeídica de peróxidos lipídicos ligam e inativam grupos sulfidrila de cisteína, que são críticos para a ação surfactante da proteína C; (2) peróxidos lipídicos se combinam com superóxidos de neutrófilos para produzir um potente iniciador de peroxidação lipídica, radical peroxila, que também é capaz de atacar o resíduo metionina do lado ativo da α_1 -antitripsina; (3) peróxidos lipídicos produzem aberrações na síntese de prostanoide e leucotrieno; e (4) peróxidos lipídicos em concentrações nanomolares aumentam a ligação de monócitos a células endoteliais e aumentam a produção de fator quimiotático de monócito, estimulando potencialmente a inflamação (HELBOCK e AMES, 1995).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de radicais livres danosos [$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} , oxigênio singleto (1O_2), radical peroxila lipídico (LOO^{\cdot})], e outras moléculas oxidativas, excede a capacidade das defesas antioxidantes do organismo (DANI *et al.*, 2004), induzindo eventos proapoptóticos na mitocôndria hepática e nos hepatócitos por causa do aumento da permeabilidade da membrana da mitocôndria pelas ERO. Essa apoptose tem sido reconhecida como um mecanismo chave da causa de injúria em doenças colestáticas hepáticas (CAI *et al.*, 2006). A maioria dos organismos vivos tem defesas antioxidantes bem desenvolvidas, com o objetivo de eliminar ERO e controlar sua concentração. Esses mecanismos incluem enzimas (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) e moléculas não enzimáticas (vitaminas A, C, E, glutathione, e coenzima Q10) (BASU *et al.*, 1999). Muitas doenças em neonatos prematuros (displasia broncopulmonar, retinopatia de prematuridade, injúria cerebral) estão relacionadas à ação de ERO. Em particular, bilirrubina não conjugada é hábil em eliminar

oxigênio singleto com alta eficiência, reagir com ânions superóxido e radicais peroxila, e servir como substrato redutor para peroxidases na presença de peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos (DANI *et al.*, 2004).

As ERO englobam uma variedade de metabólitos de oxigênio parcialmente reduzido (ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, e radicais hidroxila), que possuem reatividade maior que a do oxigênio molecular e são geradas endogenamente como consequência de funções celulares normais ou derivadas de fontes externas, neste caso a NP (SASAKI, 2006).

Glutationa é um tripeptídeo composto de glutamato, cisteína, e glicina e é o antioxidante intracelular mais importante em tecidos de mamíferos. Ela protege contra dano oxidativo causado pelos radicais livres através da reação da glutathione peroxidase e a detoxificação de metabólitos eletrofílicos por múltiplas glutathione transferases. A concentração de glutathione no fígado, local de maior síntese de glutathione e detoxificação, é particularmente alta. Contudo, a concentração de glutathione hepática é diminuída durante a TNP. Isso pode ser causado pelo aumento no consumo, aumento de oxidação e depleção de estoques de glutathione. Por outro lado, o estresse oxidativo induz, ou acompanha, a apoptose e os antioxidantes podem reduzir a apoptose hepática pela prevenção da geração de estresse oxidativo (HONG *et al.*, 2007).

O excesso de peróxidos leva ao consumo de glutathione. A conversão desses peróxidos em radicais livres leva a um aumento da transcrição do gene responsável pela produção da glutathione. Este excesso pode ser mensurado, através dos níveis hepáticos de marcadores prostanóides oxidante-sensíveis. Por sua vez, estes marcadores podem ser usados para mensurar modificações na concentração de glutathione quando há aumento da atividade antioxidante, associadas a peróxidos infundidos, como confirmação da colestase hepática por ação de peróxidos. (CHESSEX *et al.*, 2001a).

O ciclo redox da glutatona é o sistema enzimático antioxidante mais abundante e promove proteção contra ERO, particularmente peróxido de hidrogênio, pelo uso de peroxidases selênio-dependentes ou independentes para reduzir H_2O_2 e peróxidos lipídicos a água ou respectivo álcool, com a concorrente oxidação de glutatona a glutatona dissulfito (O'DONOVAN e FERNANDES, 2000).

O sistema enzimático superóxido dismutase (SOD)/catalase é um sistema de defesa contra ERO importante para o fígado. Nele, os níveis de atividade de Cobre-Zinco-superóxido dismutase (CuZn-SOD) e catalase são maiores que em outros tecidos. O complexo CuZn-SOD dismuta duas moléculas de ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, e o peróxido de hidrogênio é subsequente reduzido a água pela catalase (NISHIMURA *et al.*, 2005). O peróxido de hidrogênio infundido é quebrado rapidamente pela catalase de células vermelhas na circulação sanguínea de neonatos, porém não há qualquer antioxidante comparável para peróxidos lipídicos (SILVERS *et al.*, 2001b).

H_2O_2 em concentrações encontradas na rotina clínica de TNP induz a transformação de ácido desidroascórbico em compostos que têm potencial para afetar o metabolismo lipídico (KNAFO *et al.*, 2005).

Infelizmente, muitos agentes antioxidantes (como vitaminas E e A, ceruloplasmina e α 1-antripsina) e elementos traço (cobre, zinco, ferro e selênio – metais cofatores necessários para síntese de antioxidantes e sua atividade) são deficientes em neonatos prematuros. Muitas doenças ocorrem devido ao fato do sistema antioxidante de neonatos prematuros ser altamente estressado e incompletamente desenvolvido (DANI *et al.*, 2004). Neonatos prematuros têm baixa concentração de glutatona e alta concentração de glutatona dissulfito, comparados com adultos. As mudanças nos mecanismos antioxidantes de defesa dos neonatos, seguindo o nascimento, são

particularmente críticas em prematuros, cujo cuidado médico envolve a exposição a altas concentrações de oxigênio (oxigênio-terapia). Neles, a capacidade de defesa antioxidante poderia estar comprometida por baixos níveis de glutatona e outros antioxidantes que metabolizam as ERO, sugerindo um aumentado risco para problemas relacionados a estresse oxidativo (O'DONOVAN e FERNANDES, 2000). Não é de se surpreender que neonatos prematuros sejam mais sensíveis a complicações hepáticas devido à sua imaturidade fisiológica (CAI *et al.*, 2006).

1.7 DANO GENÉTICO E MUTAGÊNESE

Vários trabalhos científicos relatam a produção de peróxidos dentro de uma bolsa de NP (MULLER e HEINEMANN, 1994; NEUZIL *et al.*, 1995; LABORIE *et al.*, 1998; STEGER e MUHLEBACH, 1998; KITCHEN e FORBES, 2000; LABORIE *et al.*, 2000; CHESSEX *et al.*, 2001a; CHESSEX *et al.*, 2001b; GIBBONS *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2003; PIRONI *et al.*, 2003; KNAFO *et al.*, 2005; LAVOIE *et al.*, 2005; CAI *et al.*, 2006). Muitos desses trabalhos relacionam a presença de peróxido na NP a danos teciduais e celulares, principalmente relacionados ao fígado. Em neonatos, indicadores de peroxidação aumentados estão associados com maior morbidade (CHESSEX *et al.*, 2001a).

Em seu trabalho, Laborie e colaboradores (LABORIE *et al.*, 1998) mostram que a mistura de riboflavina e ácido ascórbico (como doador de elétrons), em uma solução de aminoácidos, ou uma emulsão lipídica podem gerar peróxidos em soluções de NP. Deste modo, com o sistema antioxidante ainda imaturo, a infusão de peróxidos em neonatos prematuros é no mínimo de risco biológico.

Hidroperóxidos lipídicos na sua forma livre ou na emulsão lipídica são citotóxicos e causam evidente dano a células endoteliais da aorta torácica quando administrados via intravenosa (NEUZIL *et al.*, 1995). Também, displasia broncopulmonar e retinopatia em

neonatos prematuros têm sido associadas à infusão de lipídios e essas condições têm sido ligadas a dano celular mediado pelos radicais livres (BASU *et al.*, 1999).

A proteína p53, importante supressor tumoral, pode exercer sua ação em resposta a estresse oxidativo. A ativação de p53 pelo estresse oxidativo pode resultar em apoptose (SASAKI, 2006). Estudos têm mostrado que a NP induz apoptose de células epiteliais, associada com decréscimo de expressão de RNAm de Bcl-2. Adicionalmente, a NP com lipídio aumentou a expressão de Fas e dos fatores pró-apoptótico Bad e anti-apoptótico Bcl-xl. Essas alterações podem contribuir para a injúria no hepatócito induzida por NP, por apoptose, ou tais fatores expressos podem suprimir a regeneração do hepatócito (HONG *et al.*, 2007). Já foi comprovado que radicais livres de oxigênio podem induzir mutações ativas de *c-Ha-ras*, um proto-oncogene humano (ANISIMOV, 2002).

O estresse oxidativo, por espécies reativas de oxigênio, é capaz de causar dano em vários constituintes celulares, como o DNA, proteínas e lipídios, levando à carcinogênese, envelhecimento e muitas outras doenças (OLINSKI *et al.*, 2007). Particularmente, o dano no DNA mediado pelo estresse oxidativo é crítico no processo de carcinogênese. Um dano genético, se mal-reparado, leva a mutações que podem levar à ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores de tumor (KAWANISHI *et al.*, 2001; LOFT e POULSEN, 1996).

O cromo, um elemento traço presente em formulações de oligoelementos, é potencialmente tóxico e carcinogênico em altas doses. Todos os cromatos podem entrar ativamente nas células através de canais de transferência de ânions isoelétricos e isoestruturais, como sulfato e fosfato. Uma vez dentro da célula, na presença de redutores celulares, eles podem causar uma variedade de lesões no DNA, incluindo adutos Cr-DNA, ligações cruzadas DNA-proteína, ligações cruzadas DNA-DNA e dano oxidativo (VALKO *et al.*, 2006).

Em células normais existe a freqüente formação de lesões no DNA, cerca de 10.000 depurinizações espontâneas e centenas de desaminações espontâneas de adenina e guanina por dia. Os mecanismos de reparo de DNA trabalham, com algumas exceções, para evitar que essas lesões tornem-se mutações (ANISIMOV, 2002). Boa parte dessas lesões é formada por fatores, endógenos ou exógenos, que danificam o DNA de maneira contínua. Esses incluem ERO como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil (GAO *et al.*, 2004).

As mutações no DNA por troca de bases ocorrem por transição entre bases do mesmo grupo, uma purina por outra purina ($A \leftrightarrow G$) ou uma pirimidina por outra pirimidina ($T \leftrightarrow C$), ou por transversão entre bases de grupos distintos (A ou G \leftrightarrow T ou C). Se a lesão leva a uma distorção estrutural, causando um bloqueio da progressão da molécula de DNA polimerase, ela é classificada como potencialmente letal. Se a lesão, que não leva a uma distorção estrutural, pareia com uma base não-cognata e é transpassada pelas DNA polimerases, ela é classificada como pré-mutagênica (WALLACE, 2002).

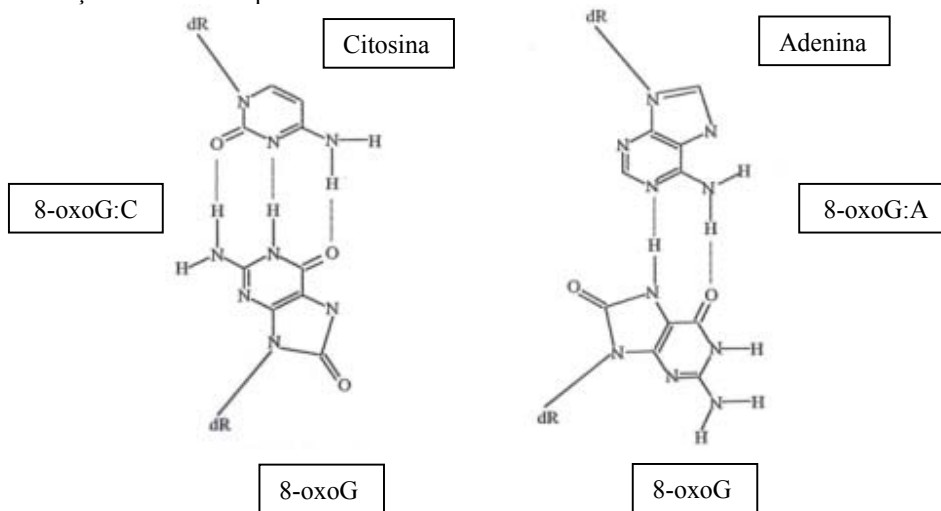
Entre muitas formas de ERO, o radical hidroxil (HO^\bullet), em particular, tem relação direta com lesões oxidativas no DNA, com a formação de um grande número de lesões pirimidínicas e purínicas (GAO *et al.*, 2004). A migração de HO^\bullet é limitada, ele reage rapidamente com componentes celulares. H_2O_2 , um precursor de HO^\bullet , é menos reativo, porém mais rapidamente difusível e assim mais comumente está envolvido na formação de bases oxidadas. Recente atenção tem sido dada a produtos de oxidação de bases nitrogenadas do DNA, com particular ênfase para a formação e reparo de 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG) (Figura 1), uma das importantes lesões em bases desemparelhadas (SASAKI, 2006). A guanina exibe o menor potencial de ionização entre as bases nitrogenadas e é o alvo preferencial para agentes oxidantes. O oxigênio singleto reage especificamente com a guanina (CADET *et al.*, 2003). A 8-

8-oxoG tem sido encontrada em DNA tratado com vários agentes oxidantes, metais, e radiação ionizante, sendo comumente utilizada como um biomarcador de estresse oxidativo (WALLACE, 2002). Sabe-se que cobre, na presença de H₂O₂ e ácido ascórbico, é capaz de gerar lesões 8-oxoG no DNA (ARUOMA *et al.*, 1991). Existem dois mecanismos de formação de 8-oxoG no DNA celular: interação direta de ERO com guanina na posição C8, e oxidação da guanina no quantitativo de nucleotídeos durante a replicação de DNA. Em células normais, tem sido estimado que cerca de 200 lesões genômicas 8-oxoG são formadas, espontaneamente, por célula por dia pelos dois mecanismos descritos anteriormente. Essas lesões oxidativas do DNA resultam em mutagênese específica e produzem transversões de G para T que são mundialmente encontradas em oncogenes e genes supressores de tumor mutados. Em adição, a guanina presente no grupo de nucleotídeos a serem incorporados ao DNA pode ser oxidada, passando a 8-oxoG, e esta, durante a replicação de DNA, pode ser incorporada à fita genética, resultando em transversões de G:C para T:A. Como pode ser visto na Figura 1, a 8-oxoG pode parear com citosina (C) ou adenina (A), sendo esta última mutacional. Quando pareada com citosina, a estrutura duplex da 8-oxoG é muito similar à estrutura normal, assumindo uma conformação *anti*. Quando pareada com adenina, a 8-oxoG assume uma conformação *sin*, formando um par de bases estável. Com isso é possível a inserção tanto da base cognata, citosina, quanto da base não-cognata, adenina. A oxidação da guanina ainda não incorporada ao DNA, a 8-oxoGTP pode ser pareada com adenina durante a replicação (WALLACE, 2002). Assim, a presença de 8-oxoG em células pode levar a mutações pontuais (GAO *et al.*, 2004; OLINSKI *et al.*, 2003; SASAKI, 2006). A lesão 8-oxoG é caracterizada como uma lesão mutagênica e não letal (WALLACE, 2002).

A carcinogênese é um processo multi-passos e multimecanístico. O modelo atual de carcinogênese indica que o primeiro passo, a “Iniciação”, é irreversível. Agentes mutagênicos são

efetivos iniciadores. Diversos estudos sobre a teoria clonal do câncer assumem que este se origina de uma única célula iniciada (TOSKO, 1992).

Figura 1: Representação estrutural do pareamento entre as bases citosina e adenina com a base oxidada 8-oxoG.



Fatores críticos que determinam a susceptibilidade de um tecido à carcinogênese incluem síntese de DNA e atividade proliferativa daquele tecido, tempo de exposição ao carcinógeno e a eficácia de reparo do DNA danificado. É sabido que a alta prevalência de câncer em indivíduos idosos simplesmente reflete um prolongado tempo de exposição a carcinógenos. Uma exposição a um carcinógeno em indivíduo jovem pode diminuir a quantidade de estágios necessários para a transição de célula saudável para célula tumoral (ANISIMOV, 2002).

Os efeitos da infusão prolongada de peróxidos em um organismo com sistema de defesa imaturo são desconhecidos (CHESSEX *et al.*, 2001b). Isto inclui a possibilidade da ação mutagênica destes peróxidos. Muitas observações indicam uma correlação direta entre a formação de 8-oxoG e a carcinogênese *in vivo*, e que as ERO são conhecidas por induzir mutagênese em códons dos genes humanos *p53*, *c-Ha-ras* e *K-ras*. As transversões G para T são

as mutações mais frequentes no gene supressor de tumor *p53* (LOFT e POULSEN, 1996; OLINSKI *et al.*, 2003). Os sistemas de defesa antioxidante são frequentemente inadequados, e o dano causado pelas ERO tem sido relacionado à carcinogênese e a doenças degenerativas relacionadas ao envelhecimento (LOFT e POULSEN, 1996). As ERO podem agir em vários estágios da carcinogênese.

1.8 REPARO DE LESÕES OXIDATIVAS NO DNA

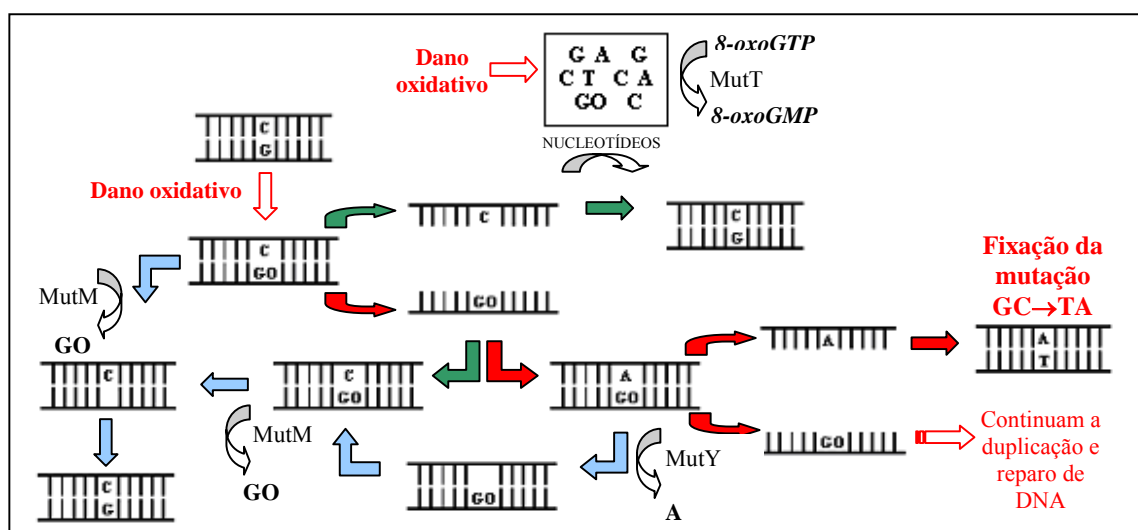
O dano oxidativo ao DNA é reparado continuamente *in vivo* por uma variedade de enzimas. DNA glicosilases retiram bases incorretas e subsequentes clivagens de ligações fosfodiéster são feitas nas extremidades abásicas pelas endonucleases, seguidas da inserção do nucleotídeo correto. Em *Escherichia coli*, as enzimas de reparo MutT e MutM cooperam funcionalmente com MutY, uma enzima que remove a adenina erroneamente pareada com a 8-oxoG no DNA (LOFT e POULSEN, 1996). Exonuclease III, endonuclease IV, atividades de excisão de endonucleases e exonucleases associadas com UvrAB são exemplos de enzimas que podem reparar DNA oxidado (MICHAELS *et al.*, 1992).

Lesões 8-oxoG em DNA celular são reparadas pela ação de formamidopirimidina-DNA-glicosilase (FPG), ou MutM em *Escherichia coli*, ou a proteína Ogg1, expressa em humanos pelo gene *hOgg1* (WALLACE, 2002). Em DNA nuclear, cerca de 90% das bases oxidadas são reparadas por mecanismos de reparo de nucleotídeos, e os restantes 10% pelo reparo por excisão de bases, indicando que o reparo de nucleotídeos é a via primária para o reparo de 8-oxoG (SASAKI, 2006). A adenina, emparelhada incorretamente com 8-oxoG, pode ser removida por uma enzima de reparo de *Escherichia coli*, MutY (ou seu homólogo humano MYH), seguida de uma inserção de citosina, levando à formação do par 8-oxoG/C, que será corrigido num reparo por excisão de bases mediado por OGG1, ou MutM, uma glicosilase que remove especificamente

a 8-oxoG do DNA (GAO *et al.*, 2004). A MTH (homóloga a MutT de *Escherichia coli*) hidrolisa a 8-oxoGTP a 8-oxoGMP, impedindo a fixação da base oxidada ao DNA (FORTINI *et al.*, 2003).

A proteína MutY é diferente de outras defesas, que procuram neutralizar as ERO ou reparar o dano que elas causam em ácidos nucleicos, pois ajuda a corrigir erros que resultam da replicação do DNA que contém o dano oxidativo. Ela remove adeninas que são incorporadas em face de lesões 8-oxoG no DNA. De fato, há um intrincado mecanismo (Esquema 1) envolvendo as proteínas MutM, MutT e MutY na proteção de células do efeito mutagênico da 8-oxoG. A falta de funcionalidade de uma dessas, em especial a MutY, leva à fixação mutacional do dano oxidativo (MICHAELS *et al.*, 1992). Células de *E. coli* defeituosas em MutM não são sensíveis a agentes oxidantes, mas são parcialmente mutadoras. A adição da mutação em *mutY* aos mutantes em *mutM* confere uma taxa de mutações espontâneas cerca de 400 vezes maior que na bactéria selvagem (WT) (WALLACE, 2002).

Esquema 1: Mecanismo de dano oxidativo em DNA envolvendo a ação mutagênica da 8-oxoG e o mecanismo de reparo envolvido (MutT, MutM e MutY). As setas em vermelho indicam uma rota da mutação por oxidação envolvendo troca de bases, GC:TA. As setas em azul indicam ação de mecanismos de reparo de lesões oxidativas de DNA. As setas em verde indicam a via normal de duplicação de DNA com correto pareamento de bases. Adaptado de FORTINI *et al.*, 2003; WALLACE, 2002; GAO *et al.*, 2004; OLINSKI *et al.*, 2003; SASAKI, 2006; e MICHAELS *et al.*, 1992.



A posição 8 no anel imidazoil da adenina também é suscetível à oxidação, formando a 7,8-dihidro-8-oxoadenina (8-oxoA). Esta, pareada com timina mantém a conformação *anti* normal, sendo este o pareamento preferencial. Já pareada com guanina ela leva a uma conformação *sin* da base oxidada. Essa lesão pode levar a transição A→G ou a transversão A→C em células de mamíferos, sendo pouco mutagênica em *E. coli*. Além da 8-oxoA, a 2-hidroxiadenina (2-oxoA) é observada em DNA oxidado, levando à substituições de base de A→G e A→T. A MutY pode remover essa lesão quando pareada com guanina (WALLACE, 2002).

1.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DA NP

Em um trabalho intitulado “Review of the Toxicologic Properties of Medium-Chain Triglycerides” (TRAUL *et al.*, 2000) foi relatado um ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade para uma emulsão lipídica contendo triglicerídeos de cadeia média. Neste trabalho foram usadas cinco cepas modificadas de *Salmonella typhimurium* na presença de ativação metabólica em um teste de mutagenicidade microbiológica de Ames (MARON e AMES, 1983), sendo positivo para uma cepa apenas.

Testes de mutagenicidade utilizando bactérias ou leveduras são os mais utilizados para a avaliação do potencial carcinogênico de várias substâncias. Se comparados com a dificuldade de se obter amostras e o tempo que se leva para concluir as análises utilizando pequenos animais e culturas de células de mamíferos, os testes usando microrganismos são, além de mais rápidos, mais baratos. Estes podem oferecer vantagens práticas e permitem penetrar nos mecanismos-base da genotoxicidade e suas conseqüências (QUILLARDET *et al.*, 1982).

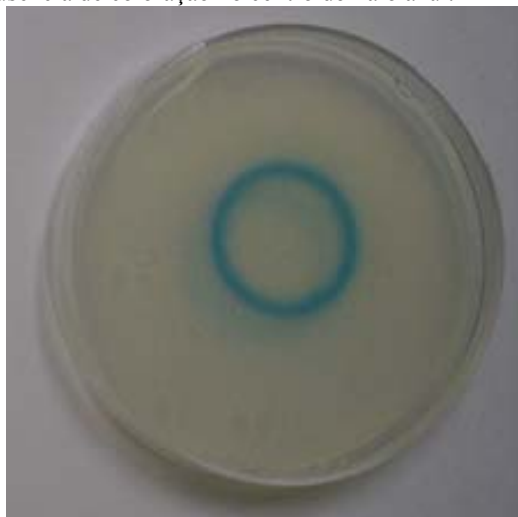
Misturas complexas com atividade genotóxica e/ou mutagênica, podendo ser carcinogênicas, podem ser investigadas pelo uso de bioensaios microbiológicos para identificação dos elementos mutagênicos e do mecanismo envolvido. O dano no DNA, acumulado ao longo da vida, pode iniciar a gênese de cânceres ou de defeitos genéticos, sendo o maior contribuinte para o envelhecimento e doenças degenerativas. A solução para esses males é a prevenção: identificando os agentes mutagênicos e minimizando a exposição humana. Para isso, inúmeros testes microbiológicos foram desenvolvidos visando a elucidação dos elementos, e mecanismos, envolvidos no dano genético (McCANN e AMES, 1976).

O entendimento da sua biologia molecular e do seu metabolismo, além do sequenciamento completo do seu genoma, torna *E. coli* o organismo teste padrão em biologia. (JOSEPHY, 2000). Alguns dos ensaios microbiológicos utilizando essa bactéria foram empregados neste trabalho visando à investigação da atividade genotóxica e mutagênica que pode estar associada à NP. Cepas de *Salmonella typhimurium* foram usadas no teste de Ames com o mesmo objetivo.

1.9.1 Avaliação de atividade genotóxica: *SOS cromoteste*

O SOS cromoteste, utilizando *Escherichia coli* mutada, é um ensaio quantitativo e/ou qualitativo que se baseia na expressão de β -galactosidase, mediante fusão do gene *lacZ* em sítio específico envolvido com a inibição da divisão celular, (gene *sfiA*). Outras duas mutações, *uvrA* e *rfa*, contribuem para a qualidade do teste, aumentando a resposta a ataques de mutagênicos (pela exclusão do reparo) e aumentando a permeabilidade da membrana celular ao agente, respectivamente. A cepa PQ37 é usada como padrão para o SOS cromoteste desde 1982 (QUILLARDET *et al.*, 1982). A geração de coloração azul (Figura 2) indica atividade genotóxica da substância em placas contendo a bactéria em meio de cultura, o “spot test” (QUILLARDET e HOFNUNG, 1985).

Figura 2: Controle Positivo com 4-NQO, potente agente genotóxico/mutagênico. O DNA é tão danificado que provoca morte celular em concentrações mais elevadas (próximas ao ponto de deposição) (halo de inibição de crescimento), apresentado pela ausência de coloração no centro do halo azul.



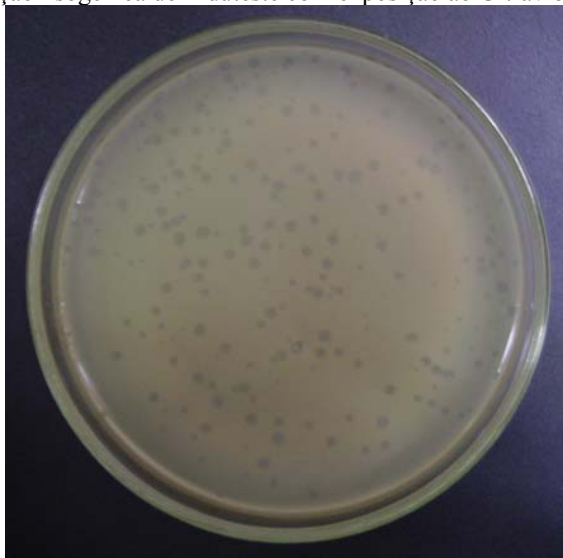
A sensibilidade do SOS cromoteste é equivalente àquela do Mutatestes e, geralmente, 4-40 vezes maior que a do Induteste (QUILLARDET *et al.*, 1982).

1.9.2 Avaliação de atividade genotóxica: *Induteste*

O conhecimento sobre a indução de profagos λ em *Escherichia coli* K12 por substâncias carcinogênicas levou ao desenvolvimento desta técnica em 1976. É um ensaio quantitativo e/ou qualitativo baseado na indução lisogênica pela ativação de profagos λ em exposição a substâncias genotóxicas. A cepa utilizada originalmente no Induteste possui mutações relacionadas à permeabilidade de membrana, no gene *envA*, e deficiência de reparo, no gene *uvrB*. O ensaio utiliza a bactéria teste contendo profago (λ) e *envA uvrB* deficiente, uma bactéria resistente à ampicilina como λ indicadora, para revelar os fagos induzidos pelo tratamento com a substância a ser testada. Dos 3 tipos de Induteste descritos no trabalho de Moreau e colaboradores, criadores da técnica, o “Induteste II” é um teste quantitativo em placa,

na qual a presença de centros infecciosos lisados (Figura 3) indica estímulo genotóxico (MOREAU *et al.*, 1976). As cepas utilizadas para este trabalho, RJF013 (indicadora) e WP2S (λ), foram construídas no laboratório de Radiobiologia Molecular, Instituto de Biofísica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sendo esta última mutante apenas em reparo (gene *uvrA*).

Figura 3: Resultado de indução lisogênica do Induteste com exposição ao Ultravioleta tipo C, controle positivo.



1.9.3 Avaliação de atividade mutagênica: *Mutateste*

Conhecido também como teste de Ames, usa cepas de *Salmonella* com mutações específicas para deficiência de histidina, permeabilidade de membrana (gene *rfa*), deficiência de reparo (gene *uvrB*) e fator de resistência à ampicilina inserido em um plasmídeo, que também contém os genes *mucA* e *mucB*, que codificam uma mutapolimerase. Como resultado de diversos testes para validação da técnica, cerca de 90% dos carcinógenos testados foram mutagênicos nesse ensaio, levando a uma discussão e conclusão de que a correlação entre carcinogenicidade e mutagenicidade de substâncias é de 83%. O princípio do teste é o uso de cepas mutantes, com um

tipo conhecido de mutação, que se tornam revertentes (reversão de auxotrofia para prototrofia – produtor de histidina) mediante danos genéticos específicos. As cepas padrão são TA97, TA98 , TA100 e TA102, variando nas mutações citadas para determinados danos genéticos, o que norteia para o possível mecanismo de mutagênese. O resultado é visto com a presença de colônias (Figura 4) mediante estímulo mutagênico ($\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$). A versão “spot test” do teste de Ames é aplicável como avaliação qualitativa inicial de uma série de compostos (MARON e AMES, 1983).

Figura 4: Controle Positivo, versão “spot test” com 4-NQO, potente agente genotóxico/mutagênico. O DNA é tão danificado que provoca morte celular (halo de inibição de crescimento), apresentado pela ausência de colônias em seu interior e delimitado por colônias revertentes ($\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$).



1.9.4 Avaliação de mecanismo de mutagenicidade: ensaio *lacZ* (Teste de Miller)

Um dos primeiros passos para elucidar a via de mutagênese é determinar a especificidade de mutações geradas espontaneamente ou por tratamento com agentes mutagênicos. Para este fim foram desenvolvidos diversos sistemas que permitem a rápida determinação de especificidade mutagênica por métodos genéticos. Entre eles, o teste de Miller se destaca por englobar cada uma das 6 possíveis substituições de bases. É um sistema que revela a substituição de uma base específica, simplesmente por medir o número de colônias de bactérias revertentes que aparecem em placa de meio seletivo. Neste ensaio são usadas 6 cepas com diferentes mutações em um mesmo códon no gene *lacZ*, que detecta, individualmente todas as 6 mutações por substituição de bases. O gene *lacZ* de *Escherichia coli*, codifica para a produção de β -galactosidase, permitindo que a lactose seja usada como fonte de carbono. As células Lac^- não crescem em meio contendo lactose, porém quando há o dano genético ela torna-se produtora da enzima e volta a crescer neste meio ($Lac^- \rightarrow Lac^+$) (Figura 5). As cepas usadas são a CC101 (AT \rightarrow CG), CC102 (GC \rightarrow AT), CC103 (GC \rightarrow CG), CC104 (GC \rightarrow TA), CC105 (AT \rightarrow TA) e CC106 (AT \rightarrow GC) (CUPPLES e MILLER, 1989). O resíduo Glu-461 foi identificado como crítico para a atividade catalítica da enzima, tornando-a inativa quando é substituído. Existem dois códons para ácido glutâmico, GAA e GAG. O tipo selvagem possui a sequência GAA para o códon 461. Para o teste de Miller todas as seqüências possuem a guanina como terceira base, levando para uma seqüência GAG no códon 461 das cepas revertentes (JOSEPHY, 2000).

Figura 5: Resultado de crescimento de bactérias revertentes ($\text{Lac}^- \rightarrow \text{Lac}^+$) por ação mutagênica.



1.9.5 Avaliação de mutagenicidade por dano oxidativo ao DNA: *Ensaio com cepa deficiente em MutY*

Este teste torna evidente a importância da defesa contra dano oxidativo ao DNA, neste caso a lesão 8-oxoG. As enzimas MutY, MutM e MutT levam à correção de erros que são induzidos pela replicação de DNA contendo lesões oxidativas como a 8-oxoG. A proteína MutY remove a adenina pareada com a 8-oxoG. Cepas que são deficientes em MutY têm elevado número de transversões GC \rightarrow TA, específicas para dano oxidativo de DNA envolvendo lesão 8-oxoG (MICHAELS *et al.*, 1992). A CC104*mutY*, deficiente em MutY, é uma cepa mutada oriunda do Teste de Miller específica para detectar transversões GC \rightarrow TA. O teste ocorre da mesma forma como no Teste de Miller (Figura 5), avaliando-se a reversão em lactose ($\text{Lac}^- \rightarrow \text{Lac}^+$), revelando a mutação por lesão oxidativa 8-oxoG no DNA.

2 OBJETIVOS

A importância da elucidação dos mecanismos envolvendo toxicidade associada ao uso da NP, principalmente em longo prazo, é indiscutível, levando-se em consideração a fragilidade do usuário em TNP, abordado neste trabalho. A aplicação da TNP ao neonato, principalmente aos prematuros pode levar a complicações bem conhecidas e algumas delas com mecanismos bem definidos. A possível atividade genotóxica e/ou mutagênica associada à NP, pela ação dos peróxidos gerados na mistura ou por outros elementos indutores, deve ser investigada e correlacionada com o que já foi citado na literatura relativo ao uso da NP e sua toxicidade. A ação das condições de armazenamento, do tempo de preparo, da presença de vitaminas e oligoelementos, da concentração da mistura, entre outros, devem ser avaliados, permitindo nortear para a condição mais segura para o paciente em TNP.

2.1 OBJETIVO GERAL

Resultados preliminares ao projeto, apontando para uma atividade genotóxica associada à NP, permitiram a definição dos objetivos a serem alcançados por este trabalho, tendo como objetivo geral:

- *Caracterizar o potencial genotóxico e mutagênico de misturas 3:1 de Nutrição Parenteral voltadas para pacientes neonatos utilizando testes rápidos em procariotos.*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Levando-se em consideração estes resultados preliminares e a disponibilidade de mecanismos de investigação mais específicos foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- *Identificar os componentes responsáveis pela genotoxicidade e mutagenicidade das misturas de 3:1 de NP testadas;*
- *Avaliar e associar condições de armazenamento que modulem a atividade genotóxica e mutagênica das misturas 3:1 de NP voltadas para pacientes neonatos;*
- *Avaliar a atividade genotóxica e/ou mutagênica dessas misturas 3:1 de NP levando-se em consideração tempo de preparo e concentração;*
- *Buscar entender os mecanismos envolvidos na atividade genotóxica e mutagênica dessas misturas 3:1 de NP através do uso de cepas de microrganismos específicos e;*
- *Orientar, baseado nos resultados encontrados, para alternativas que diminuam o potencial risco genotóxico e/ou mutagênico associado ao uso dessas misturas 3:1 de NP em neonatos, alertando para os possíveis danos em longo prazo advindos do uso inapropriado dessas NP.*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

O trabalho tem ponto de partida na escolha de formulações 3:1 de NP usadas em 2 trabalhos associados à estabilidade de NP (LOBO, 2005; RIBEIRO, 2007), mostrados no Quadro 4.

As amostras foram cedidas pela Nutriente (RN Center Produtos e Serviços Farmacêuticos Ltda.), empresa especializada na produção de NP para pacientes infanto-juvenis e adultos, mediante prescrição médica. As preparações seguiram rigoroso controle de assepsia, levando em consideração estrutura e metodologias adequadas às exigências da RDC 272 (ANVISA-BRASIL, 1998). Como as formulações são personalizadas, adaptadas ao paciente, a escolha de formulações que melhor se aproximassem da realidade foi de vital importância. Por este motivo, as formulações de escolha seguiram as recomendações citadas nos Quadros 2 e 3.

As formulações seguiram concentrações utilizadas em rotina clínica e foram calculadas para simular o uso contínuo, por 24 horas, da mistura em um paciente neonato prematuro pesando 1,0 kg de peso. Este peso foi a base para o cálculo da concentração final da formulação de NP, com um volume final de 100 mL.

Para a execução dos testes do projeto as formulações oficiais foram as NPS (Nutrição Parenteral sem vitaminas ou oligoelementos), NPO (Nutrição Parenteral com oligoelementos) e NPV (Nutrição Parenteral com vitaminas). Contudo, para o SOS cromoteste foram feitas alterações na formulação (Quadro 7) visando avaliar a importância de cada elemento da formulação para o resultado obtido.

Quadro 4: Composição das formulações base de NP usadas para avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade.

Macronutrientes	NPO	NPV	NPS
Aminoácidos (g/kg)	3,0	3,0	3,0
Glicose (mg/kg/min)	6,0	6,0	6,0
Emulsão Lipídica (g/kg)	2,0	2,0	2,0
Eletrólitos (mEq/kg)			
Cloreto de Sódio	4,0	4,0	4,0
Cloreto de Potássio	1,0	1,0	1,0
Gluconato de Cálcio	1,5	1,5	1,5
Glicerofosfato de Sódio	1,5	1,5	1,5
Sulfato de Magnésio	0,25	0,25	0,25
Vitaminas (5 mL)			
Vit. A – 3300 UI			
Vit. D – 5,0 µg			
Vit. E – 10 mg			
Vit. C – 100 mg			
Vit. B ₁ – 3,0 mg			
Vit. B ₂ – 3,6 mg			
Pantotenato – 15 mg	-	0,5	-
Vit. B ₅ – 40,0 mg			
Vit. B ₆ – 4,0 mg			
Vit. B ₁₂ – 5,0 µg			
Biotina – 60 µg			
Folato – 400 µg			
Oligoelementos (1 mL)			
Zinco – 500 µg			
Cobre – 100 µg			
Manganês – 10 µg	0,2	-	-
Cromo – 1 µg			

A composição dos macronutrientes utilizados neste trabalho (aminoácidos e lipídios) para a mistura 3:1 de NP está indicada no Quadro 5.

Quadro 5: Composição dos macronutrientes utilizados para o preparo das NP utilizadas neste trabalho.

Macronutrientes	Produto	Composição	Quantidade	Volume total
Aminoácidos (Proteínas)	Solução de aminoácidos 10%	Isoleucina	0,670 g/100 mL	250 mL
		Leucina	1,000 g/100 mL	
		Valina	0,760 g/100 mL	
		Lisina	1,100 g/100 mL	
		Metionina	0,240 g/100 mL	
		Fenilalanina	0,420 g/100 mL	
		Treonina	0,370 g/100 mL	
		Triptofano	0,200 g/100 mL	
		Histidina	0,380 g/100 mL	
		Arginina	0,840 g/100 mL	
		Alanina	0,800 g/100 mL	
		Ácido aspártico	0,600 g/100 mL	
		Cisteína	0,190 g/100 mL	
		Ácido glutâmico	1,000 g/100 mL	
		Glicina	0,400 g/100 mL	
		Prolina	0,300 g/100 mL	
		Serina	0,400 g/100 mL	
		Tirosina	0,045 g/100 mL	
Ornitina	0,249 g/100 mL			
Taurina	0,060 g/100 mL			
Lipídios	Emulsão lipídica 20% TCL/TCM	Óleo de soja (TCL)	100 g/L	500 mL
		Triglicerídeos de cadeia média (TCM)	100 g/L	
		Glicerol	25 g/L	
		Lecitina de ovo	12 g/L	
		Oleato de sódio	0,3 g/L	
		α -tocoferol	0,2 g/L	
		Ácido linoléico	24,0-29,0 g/L	
		Ácido α -linolênico	2,5-5,5 g/L	

3.2 CONDIÇÕES DE ENSAIO

3.2.1 **Tempo após o preparo da NP**

As amostras para os experimentos foram utilizadas com dois tempos de preparo. O tempo “0 h” (zero hora) refere-se à utilização das amostras em até 2 horas após o preparo. Já o tempo “48 h” refere-se à utilização das amostras 48 horas após o seu preparo, sob diferentes condições de armazenamento. O tempo de preparo “48 h” remete-se ao período de validade das NP manipuladas extemporâneas, 48 horas, determinado pela empresa que cede as amostras, seguindo recomendações da RDC 272 (ANVISA-BRASIL, 1998). O uso das amostras nos diferentes tempos após o preparo tem como objetivo avaliar a influência desse fator sobre os resultados obtidos. Para o Induteste foi aplicada uma programação experimental na qual se avaliaram as amostras de NP nos tempos 0 hora, 12 horas, 24 horas, 48 horas e 7 dias, decorridos após o preparo das formulações analisadas.

3.2.2 **Temperatura de armazenamento da NP**

As formulações com tempo de preparo de “48 h” foram armazenadas em diferentes temperaturas. As temperaturas de armazenamento foram aplicadas até que houvessem decorrido 48 horas após o preparo das NP para variar a resposta obtida nos testes e avaliar a influência de cada temperatura sobre os resultados obtidos. Foram utilizadas 3 temperaturas de armazenamento: 2-8°C, conforme recomendações da RDC 272 (ANVISA-BRASIL, 1998) para armazenamento da NP; 25°C ($\pm 2^\circ$), simulando condições de armazenamento em temperatura ambiente (Exemplo: temperatura do setor de UTI NEO); e 37°C ($\pm 2^\circ$), simulando a temperatura corpórea do paciente neonato, e/ou da incubadora, em TNP. Ao tempo “0 h” aplicou-se apenas a temperatura padrão de transporte, 2-8°C, conforme recomendações da RDC 272 (ANVISA-BRASIL, 1998) para transporte da NP.

3.2.3 Fotoproteção da NP

O uso de fotoproteção é recomendado pelos motivos já esclarecidos neste texto. Esta condição foi aplicada somente às preparações avaliadas no tempo “48 h” e para as temperaturas de armazenamento 25°C ($\pm 2^\circ$) e 37°C ($\pm 2^\circ$), simulando condições ambientais de iluminação. O uso de diferentes NP armazenadas com fotoproteção (c/foto) ou sem fotoproteção (s/foto) teve como objetivo avaliar a influência do fator fotoexposição sobre os resultados obtidos. Ao tempo “0 h” aplicou-se apenas a condição de fotoproteção.

3.2.4 Concentração da amostra

Algumas amostras foram diluídas em meio de cultura visando avaliar a influência do fator concentração da NP sobre crescimento celular. Esta diluição foi aplicada nos tempos “0 h” e “48 h”, sendo somada a influência das diferentes condições de ensaio ao tempo “48 h”. As concentrações utilizadas foram as de 5%, 10% e 50%.

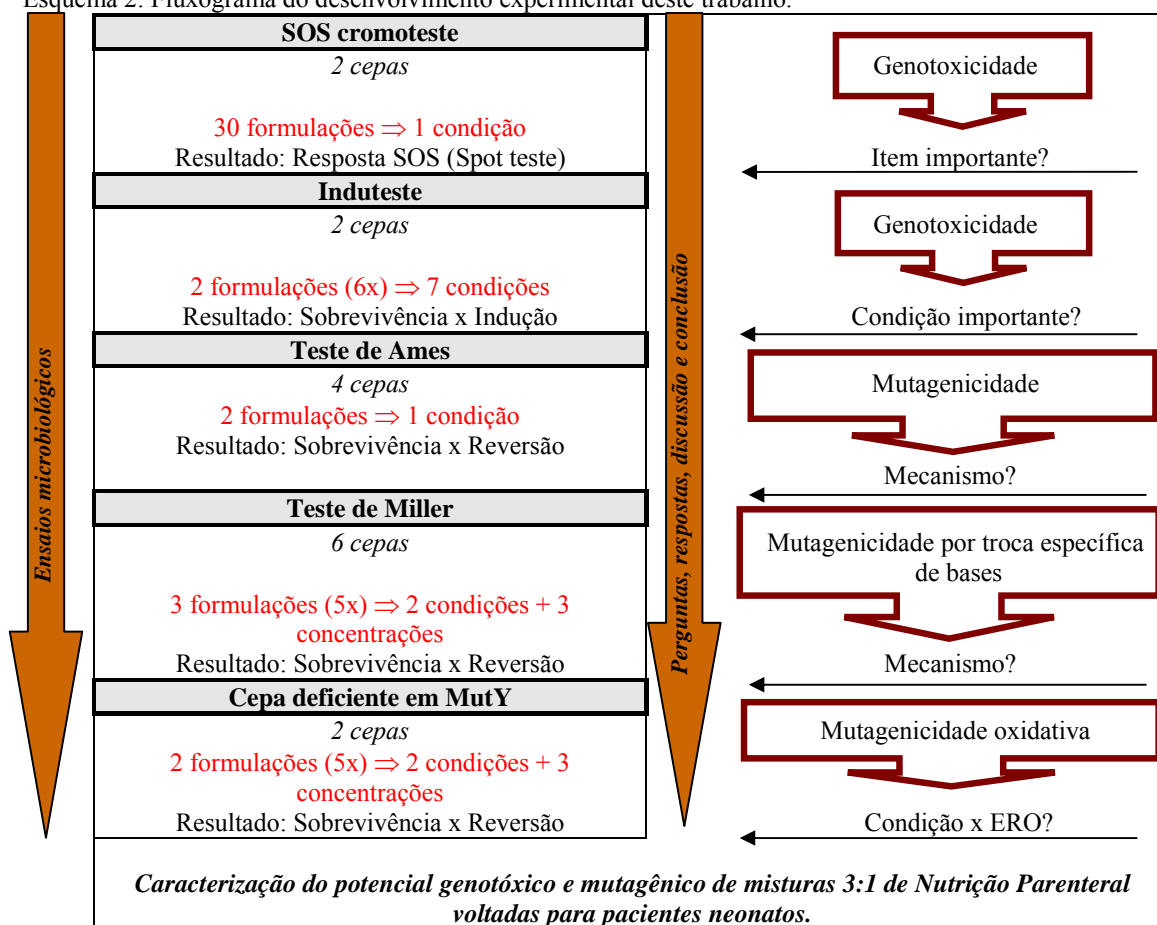
3.3 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Conforme citado anteriormente, foram realizados os seguintes ensaios: o SOS cromoteste, o Induteste, o Mutateste, o Teste de Miller e o Ensaio com cepa *mutY* (Esquema 2), variando as condições de ensaio já citadas. O Quadro 6 apresenta, de forma resumida, os testes realizados, as cepas utilizadas em cada teste, as variações genéticas encontradas e os resultados esperados. O material e os métodos aplicados a cada ensaio foram extraídos dos artigos de referência de cada teste, citados na sua descrição. Os testes foram feitos em replicatas e seus resultados foram avaliados estatisticamente.

Quadro 6: Relação de testes microbiológicos, cepas utilizadas, mecanismo, mutações específicas e resultado esperado.

Teste	Cepas	Mecanismo	Características	Resultado
SOS Cromoteste <i>E. coli</i>	PQ35 PQ37	•Indução de resposta SOS •Genotoxicidade	<i>sfiA::lacZ</i> - β -gal <i>uvrA</i> - reparo (PQ37) <i>rfa</i> - permeabilidade	•Reação ao X-gal •Coloração azul
Induteste <i>E. coli</i>	WP2S(λ) RJF013	•Indução de resposta SOS •Genotoxicidade	Profago λ <i>uvrA</i> - reparo	•Sobrevivência •Indução de fagos
Ames <i>S. typhimurium</i>	TA97 TA98 TA100 TA102	•Indução de resposta SOS •Mutagenicidade	<i>his</i> ⁻ - reversão <i>uvrB</i> - reparo <i>rfa</i> - permeabilidade pKM101 (TA97, TA98, TA100 e TA 102) pAQ1 (TA102)	•Sobrevivência •Reversão <i>his</i> ⁻ \rightarrow <i>his</i> ⁺
Miller <i>E. coli</i>	CC101 CC102 CC103 CC104 CC105 CC106	•Especificidade mutagênica por substituição de bases •Mutagenicidade	<i>lacZ</i> - reversão	•Sobrevivência •Reversão <i>lacZ</i> ⁻ \rightarrow <i>lacZ</i> ⁺
Cepa deficiente em MutY, <i>E. coli</i>	CC104 CC104 <i>mutY</i>	•Especificidade mutagênica por dano oxidativo •Mutagenicidade	<i>mutY</i> - GC \rightarrow TA	•Sobrevivência •Reversão <i>lacZ</i> ⁻ \rightarrow <i>lacZ</i> ⁺

Esquema 2: Fluxograma do desenvolvimento experimental deste trabalho.



3.3.1 Material de laboratório

- Pipetadores Gilson - 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1 mL e 5 mL;
- Vortex;
- Ultracentrífuga - Sorval® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge da Dupont Instruments;
- Centrífuga – Minispin da Eppendorf;
- Focélula - CX-254 UVC da Vilber Lourmat;
- Dosímetro de UV - VLX-3CN;
- Balança de precisão (2 casas decimais) - A1000 da Marte;

- Balança de precisão (4 casas decimais) - AA160 da Denver Instrument;
- Medidor de pH - pH300 da Analyser;
- Aquecedor/agitador - Corning Hot Plate Stirrer PC-351;
- Material estéril - Erlenmeyers, Eppendorf, Tubos de vidro, Pipetas (1 mL, 5 mL e 10 mL), Placas de vidro, Placas plásticas, Garrafas de vidro 500 mL e 1000 mL.

3.3.2 Soluções e meios de cultura

3.3.2.1 Meio LB

- Composição: cloreto de sódio (10,0 g), Bacto Triptona (10,0 g), Extrato de levedura (5,0 g) e água deionizada (q.s.p. 1000 mL)
- Modo de preparo: Adicionar todos os ingredientes em recipiente adequado, avolumar e autoclavar a 121°C a 121°C por 30 minutos.

3.3.2.2 Meio LB_{sólido}

- Composição: cloreto de sódio (10,0 g), Bacto Triptona (10,0 g), Extrato de levedura (5,0 g), Agar Difco (15,0 g) e água destilada (q.s.p. 1000 mL)
- Modo de preparo: Adicionar todos os ingredientes em recipiente adequado, avolumar e autoclavar a 121°C por 30 minutos. Após autoclavagem distribuir em placas.

3.3.2.3 Meio M63

- Composição:
 - Solução A: fosfato de potássio monobásico (8,16 g), sulfato de amônio (1,2 g), sulfato ferroso (300 µg), sulfato de magnésio (0,12 g) e água destilada (221 mL).

- Solução B: Agar Difco (9,0 g) e água destilada (350 mL).

- Modo de preparo: Adicionar todos os ingredientes em recipientes adequados para Solução A e Solução B, avolumar e autoclavar a 121°C por 30 minutos. Misturar, em recipiente adequado, as duas soluções autoclavadas e adicionar (para 600 mL de volume final do meio): lactose 20% (1,2 mL), glicose 20% (0,3 mL), triptofano 0,2% (6,0 mL), treonina 0,2% (6,0 mL), histidina 0,2% (6,0 mL), uracil 0,2% (6,0 mL), tiamina 1,0% (1,2 mL), ampicilina 10 mg/mL (1,2 mL) e X-gal 20 mg/mL (1,2 mL). Após a mistura distribuir em placas.

3.3.2.4 Meio Top Agar

- Composição: cloreto de sódio (0,8%), Agar Difco (0,7%) e água destilada (q.s.p. 200 mL).
- Modo de preparo: Adicionar todos os ingredientes em recipiente adequado, avolumar e autoclavar a 121°C por 30 minutos.

3.3.2.5 Meio MMM-glicose

- Composição:
 - Sais MMM-10x: fosfato de potássio dibásico (105,0 g), fosfato de potássio monobásico (45,0 g), sulfato de amônio (10,0 g), citrato de sódio (5,0 g) e água destilada (q.s.p. 1000 mL).
 - Agar: Agar Difco (9,0 g) e água destilada (533 mL).
- Modo de preparo: Adicionar todos os ingredientes em recipientes adequados para solução de Sais MMM-10x e Agar, avolumar e autoclavar a 121°C por 30 minutos. Após a autoclavagem adicionar ao frasco de Agar: Sais MMM-10x (60,0 mL), tiamina 1,0% (300 µL), glicose 20% (6,0 mL), casaminoácido

10% (240 μ L), sulfato de magnésio 1M (600 μ L). Após a mistura distribuir em placas.

3.3.2.6 Meio MMM-lactose

- Composição:
 - Sais MMM-10x: fosfato de potássio dibásico (105,0 g), fosfato de potássio monobásico (45,0 g), sulfato de amônio (10,0 g), citrato de sódio (5,0 g) e água destilada (q.s.p. 1000 mL).
 - Agar: Agar Difco (9,0 g) e água destilada (533 mL).
- Modo de preparo: Adicionar todos os ingredientes em recipientes adequados para solução de Sais MMM-10x e Agar, avolumar e autoclavar a 121°C por 30 minutos. Após a autoclavagem adicionar ao frasco de Agar: Sais MMM-10x (60,0 mL), tiamina 1,0% (300 μ L), lactose 20% (6,0 mL), casaminoácido 10% (240 μ L), sulfato de magnésio 1M (600 μ L). Após a mistura distribuir em placas.

3.3.2.7 Meio MEVB

- Composição:
 - MEVB-50x: sulfato de magnésio (10,0 g), ácido cítrico (100,0 g), fosfato de potássio dibásico (500,0 g), fosfato de sódio e amônio (175,0 g) e água destilada (q.s.p. 1000 mL).
 - Agar: Agar Difco (9,0 g) e água destilada (558 mL).
- Modo de preparo: Adicionar todos os ingredientes em recipientes adequados para solução MEVB-50x e Agar, avolumar e autoclavar a 121°C por 30

minutos. Após a autoclavagem adicionar ao frasco de Agar: MEVB-50x (12,0 mL) e glicose 40% (30,0 mL). Após a mistura distribuir em placas.

3.3.2.8 Meio GS

- Composição: cloreto de sódio (0,5%), Agar Difco (0,6%) e água destilada (q.s.p. 1000 mL).
- Modo de preparo: Adicionar todos os ingredientes em recipiente adequado e autoclavar a 121°C por 30 minutos. Após a autoclavagem adicionar ao frasco de GS: Solução Mista (10,0 mL) a cada 100,0 mL de GS.

3.3.2.9 Solução Mista

- Composição: monoclорidrato de L-histidina monohidratada (11,0 mg), D-biotina (12,36 mg) e água destilada estéril (100 mL).
- Modo de preparo: Adicionar todos os ingredientes em recipiente adequado e esterilizar por filtração em filtros milipore 0,22 µm.

3.3.2.10 Solução tampão M9

- Composição: fosfato de sódio (7,52 g), fosfato de potássio monobásico (3,0 g), cloreto de amônio (1,0 g), cloreto de sódio (0,5 g) e água destilada (q.s.p. 1000 mL).
- Modo de preparo: Adicionar todos os ingredientes em recipientes adequados, para conter 100,0 mL de M9 em cada frasco, e autoclavar a 121°C por 30 minutos. Após a autoclavagem adicionar ao frasco de M9: cloreto de cálcio 0,1M (0,1 mL) e sulfato de magnésio (0,1 mL), para cada 100,0 mL de M9.

3.3.3 Procedimentos técnicos

3.3.3.1 SOS cromoteste

- Cultivar as cepas PQ35 e PQ37 em Erlenmeyer contendo 5 mL de LB_{amp(20 µg/ml)} durante a noite em estufa a 37°C sob agitação;
- Transferir 0,25 mL do meio contendo o microrganismo para Erlenmeyer com 10 mL de LB_{amp(20 µg/ml)} e cultivar até a fase exponencial (10^8 células/mL), por cerca de 2 horas em estufa a 37°C sob agitação;
- Verter sobre as placas contendo meio para SOS cromoteste (M63 acrescido de X-gal) cerca de 0,1 mL do meio, contendo o microrganismo em fase exponencial de crescimento, mais 3 mL de Top Agar e deixar secar (± 10 minutos);
- Usar um pipetador para depositar, cuidadosamente, uma gota (10-20 µL) da amostra de NP a ser testada sobre a cultura na placa (no centro), devidamente identificada, e deixar secar (20-40 minutos);
- Utilizar 4-nitroquinoleína,1-óxido (4NQO) para controle positivo e água estéril para injetáveis como controle negativo;
- Colocar as placas em estufa a 37°C e deixar por 24 horas;
- Avaliar o aparecimento de coloração azul no local da aplicação da amostra.

3.3.3.2 Induteste

- Cultivar as cepas WP2S(λ) e RJF013 (bactéria indicadora) em Erlenmeyer contendo 10 mL de LB e em Erlenmeyer contendo 10 mL de LB_{amp(20 µg/ml)}, respectivamente, durante a noite em estufa a 37°C sob agitação;

- Transferir 0,25 mL do meio contendo a cepa WP2S(λ) para Erlenmeyer contendo 10 mL de LB e cultivar até a fase exponencial (10^8 células/mL), por cerca de 2 horas em estufa a 37°C sob agitação;
- Centrifugar o meio contendo a cepa WP2S(λ), em fase exponencial de crescimento, a 8000 rpm por 10 minutos e ressuspender em Erlenmeyer contendo 10 mL de solução tampão M9;
- Promover sucessivas diluições da cepa WP2S(λ) em tubos de vidro contendo solução tampão M9 para se obter até 10^3 células/mL;
- Em tubos de vidro colocar 0,1 mL da amostra de NP a ser testada e adicionar 0,1 mL da cepa WP2S(λ) nas diferentes diluições e incubar por 20 minutos a 37°C;
- Separar placas contendo meio LB_{sólido} para avaliação da sobrevivência e da indução;
- Para avaliação da sobrevivência: adicionar 3 mL de Top Agar ao tubo contendo a amostra de NP e o microrganismo WP2S(λ) e verter todo o conteúdo deste tubo na placa devidamente identificada, e deixar secar (20-40 minutos);
- Para avaliação da indução: adicionar 3 mL de Top Agar e 0,3 mL do meio contendo a cepa RJF013 (em fase estacionária) de crescimento ao tubo contendo a amostra de NP e o microrganismo WP2S(λ) e verter todo o conteúdo deste tubo na placa devidamente identificada, e deixar secar (20-40 minutos);

- Para controle positivo utilizar exposição do microrganismo WP2S(λ), após a ressuspensão em solução tampão M9, a 2 J/m^2 de ultravioleta tipo C (UVC-254 nm) e proceder à avaliação da sobrevivência e da indução;
- Para controle negativo avaliar a indução espontânea do microrganismo WP2S(λ) e a sobrevivência sem adição de amostra;
- Colocar as placas na estufa a 37°C e deixar por 24 horas;
- Promover a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) para a sobrevivência e de centros infecciosos para a indução.

3.3.3.3 Ensaio com cepa *MutY*

- Cultivar as cepas *MutY* em Erlenmeyers contendo 10 mL de LB, durante a noite em estufa a 37°C sob agitação;
- Utilizar tubos de vidro para promover sucessivas diluições, com LB, dos meios contendo as cepas até que os tubos devidamente identificados contenham 500 células em 2 mL de uma mistura de LB e NP em concentrações distintas (5%, 10% e 50%). Para controle negativo promover a mistura das bactérias diluídas a 500 células com 2 mL de LB e identificar;
- Incubar os tubos contendo as bactérias e a NP, nas diferentes concentrações, em estufa a 37°C por 24 horas, sob agitação;
- Para avaliação da sobrevivência: retirar os tubos da estufa e promover sucessivas diluições para até 10^3 células/mL e desta diluição retirar 0,1 mL e adicionar à placa contendo meio MMM-glicose, promovendo espalhamento da amostra pelo meio com o uso de pequenas pérolas de vidro;

- Para avaliação da mutagenicidade específica por substituição de bases: retirar os tubos da estufa, retirar 0,1 mL e adicionar à placa contendo meio MMM-lactose, promovendo espalhamento da amostra pelo meio com o uso de pequenas pérolas de vidro;
- Para controle negativo utilizar os tubos identificados para controle e proceder conforme indicado para sobrevivência, avaliação de mutagenicidade oxidativa;
- Deixar secar e colocar as placas na estufa a 37°C, deixando por 24 horas para avaliação da sobrevivência e por 48 horas para avaliação da mutagenicidade;
- Promover a contagem de UFC para a sobrevivência e de UFC revertentes para a mutagenicidade.

3.3.3.4 Teste de Miller

- Cultivar as cepas CC101, CC102, CC103, CC104, CC105 e CC106 em Erlenmeyers contendo 10 mL de LB, durante a noite em estufa a 37°C sob agitação;
- Utilizar tubos de vidro para promover sucessivas diluições, com LB, dos meios contendo as cepas até que os tubos devidamente identificados contenham 500 células em 2 mL de uma mistura de LB e NP (1:1). Para controle negativo promover a mistura das bactérias diluídas a 500 células com 2 mL de LB e identificar;
- Incubar os tubos contendo as bactérias e a NP, em estufa a 37°C por 24 horas, sob agitação;

- Para avaliação da sobrevivência: retirar os tubos da estufa e promover sucessivas diluições para até 10^3 células/mL e desta diluição retirar 0,1 mL e adicionar à placa contendo meio MMM-glicose, promovendo espalhamento da amostra pelo meio com o uso de pequenas pérolas de vidro;
- Para avaliação da mutagenicidade específica por substituição de bases: retirar os tubos da estufa, retirar 0,1 mL e adicionar à placa contendo meio MMM-lactose, promovendo espalhamento da amostra pelo meio com o uso de pequenas pérolas de vidro;
- Para controle negativo utilizar os tubos identificados para controle e proceder conforme indicado para sobrevivência, avaliação de mutagenicidade pela troca específica de bases;
- Deixar secar e colocar as placas na estufa a 37°C , deixando por 24 horas para avaliação da sobrevivência e por 48 horas para avaliação da mutagenicidade;
- Promover a contagem de UFC para a sobrevivência e de UFC revertentes para a mutagenicidade.

3.3.3.5 Mutateste - “spot test”

- Cultivar as cepas TA97, TA98 e TA100 em Erlenmeyer contendo 10 mL de $\text{LB}_{\text{amp}(20 \mu\text{g/ml})}$ e a cepa TA102 em Erlenmeyer contendo 10 mL de $\text{LB}_{\text{amp}(20 \mu\text{g/ml})+\text{tet}(10 \mu\text{g/ml})}$ em estufa, sob agitação, a 37°C por 16 horas;
- Centrifugar a 8000 rpm por 2 minutos, desprezar o sobrenadante e ressuspender em 2 mL de solução tampão M9. Repetir o processo;
- Para preparar a placa para o “spot test”: Adicionar 0,1 mL de solução contendo a cepa a ser testada a 2,5 mL de uma mistura de GS e solução mista

(10:1), verter em placas contendo meio MEVB, devidamente identificadas, e aguardar solidificar o meio (20-40 minutos).

- Para avaliação da mutagenicidade: Transferir um disco de papel filtro estéril para o centro da placa preparada para o teste. Adicionar, sobre este disco, 10 μ L da amostra de NP sob avaliação e incubar por 48 horas em estufa a 37°C;
- Promover a avaliação de aumento no número de UFC revertentes evidenciando mutagenicidade, ou a formação de halo evidenciando citotoxicidade, ao redor do disco de papel contendo a amostra.

3.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para formatação dos gráficos e análise estatística dos resultados foi utilizado o software GraphPad Prisma 5.01 para Windows. A análise estatística foi realizada através do método “One-Way Anova”.

4 **RESULTADOS**

4.1 SOS CROMOTESTE

O SOS cromoteste foi realizado com 30 amostras de NP (Quadros 7A e 7B), com o qual foi avaliada a importância de cada item da formulação sobre o efeito genotóxico da NP. As amostras testadas foram variações de duas formulações base, NPO e NPV, nas quais cada item foi analisado separadamente (Quadro 7B) ou a formulação testada não continha determinado item comparado à NPO ou NPV (Quadro 7A). As amostras avaliadas receberam uma identificação numérica variando de NP1 a NP28. As amostras testadas não passaram por qualquer condição de armazenamento, sendo testadas até 2 horas após o preparo.

O SOS cromoteste “Spot test” é uma modalidade qualitativa do teste. Ele indica se a amostra avaliada possui, ou não, caráter genotóxico. A positividade vem no aparecimento da coloração azul no local onde foi depositada a amostra. Em caso negativo não há alteração de cor local.

Quadros 7A e 7B, representando os resultados obtidos no ensaio SOS cromoteste com a formulação contendo a exclusão de um item e o item excluído analisado separadamente, respectivamente. Os cálculos da composição foram feitos conforme indicado no Quadro 4, com peso para cálculo de 1,0 kg. O resultado da análise é representado pelos sinais + ou - para genotóxico ou não genotóxico, respectivamente. Os controles, positivo (UVC e 4NQO) e negativo (ÁGUA), são representados no Quadro 7B.

Quadro 7A	NPV	NPO	NP1	NP2	NP3	NP4	NP5	NP6	NP7	NP8	NP9	NP10	NP11	NP12	NP13	NP14	NP15	NP16	NP17
Aminoácidos (g/kg)	3,0	3,0	*	*	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Glicose (mg/kg/min)	6,0	6,0	6,0	6,0	*	*	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Emulsão Lipídica (g/kg)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	*	*	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Eletrólitos (mEq/kg)																			
Cloreto de Sódio	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	*	*	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Cloreto de Potássio	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	*	*	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Gluconato de Cálcio	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	*	*	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Glicerofosfato de Sódio	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	*	*	1,5	1,5	1,5
Sulfato de Magnésio	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	*	*	0,25
Vitaminas (5 ml)																			
Solução padrão	0,5	*	0,5	*	0,5	*	0,5	*	0,5	*	0,5	*	0,5	*	0,5	*	0,5	*	*
Oligoelementos (1 ml)																			
Solução padrão	*	0,2	*	0,2	*	0,2	*	0,2	*	0,2	*	0,2	*	0,2	*	0,2	*	0,2	*
Volume total (mL) - q.s.p. água	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
PQ35																			
PQ37																			
Genotoxicidade	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Quadro 7B	NP18	NP19	NP20	NP21	NP22	NP23	NP24	NP25	NP26	NP27	NP28	UVC	4NQO	ÁGUA
Aminoácidos (g/kg)	3,0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	3,0	*	*	*
Glicose (mg/kg/min)	*	6,0	*	*	*	*	*	*	*	*	6,0	*	*	*
Emulsão Lipídica (g/kg)	*	*	2,0	*	*	*	*	*	*	*	2,0	*	*	*
Eletrólitos (mEq/kg)														
Cloreto de Sódio	*	*	*	4,0	*	*	*	*	*	*	4,0	*	*	*
Cloreto de Potássio	*	*	*	*	1,0	*	*	*	*	*	1,0	*	*	*
Gluconato de Cálcio	*	*	*	*	*	1,5	*	*	*	*	1,5	*	*	*
Glicerofosfato de Sódio	*	*	*	*	*	*	1,5	*	*	*	1,5	*	*	*
Sulfato de Magnésio	*	*	*	*	*	*	*	0,25	*	*	0,25	*	*	*
Vitaminas (5 ml)														
Solução padrão	*	*	*	*	*	*	*	*	0,5	*	0,5	*	*	*
Oligoelementos (1 ml)														
Solução padrão	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,2	0,2	*	*	*
Volume total (mL) - q.s.p. água	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	*	*	*
PQ35														
PQ37														
Genotoxicidade	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

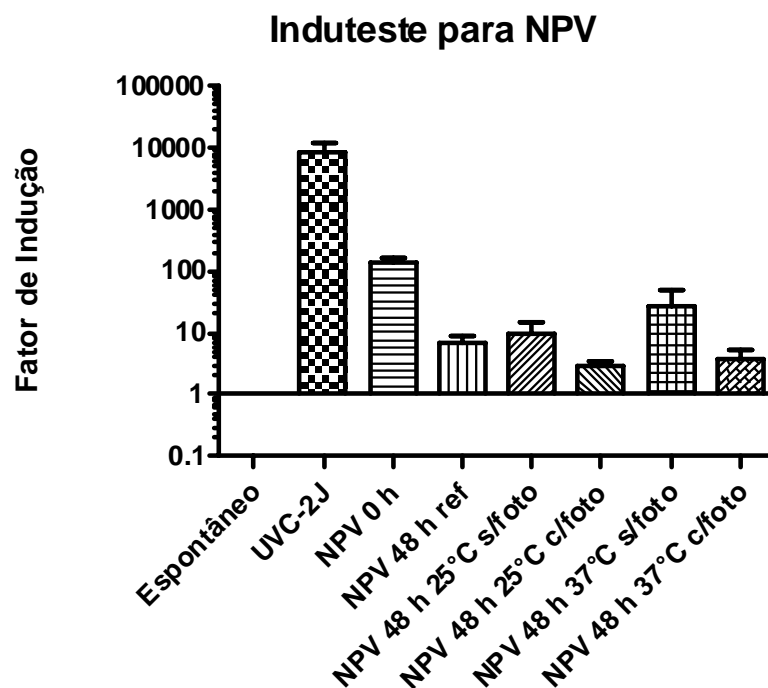
Das amostras testadas, as formulações NPO, NPV, NP3 a NP18, formulações contendo aminoácidos, e NP28, solução de aminoácidos analisada isoladamente, induziram resposta SOS nas cepas PQ35 e PQ37. Já as amostras NP1, NP2, formulações que não continham aminoácidos, e NP19 a NP27, itens das formulações analisados isoladamente, não foram genotóxicas para as cepas do teste, evidenciado pela ausência da coloração azul no local da aplicação das amostras. Os controles positivo e negativo apresentaram os resultados esperados, UVC promoveu alteração de cor, água não foi genotóxica. 4NQO foi tão genotóxica que induziu morte celular, evidenciada pela formação de um anel azul, cujo interior sem cor destaca a morte celular e à medida que a amostra se diluiu pelo meio, e tornou-se menos concentrada, permitiu que as células sobrevivessem (onde há coloração azul). Das amostras testadas, nenhuma causou morte celular visto que não houve a formação do anel azul característico (Ver Quadros 7A e 7B).

4.2 INDUTESTE

Para o Induteste foram usadas as duas formulações base do projeto, NPO e NPV. Estas foram avaliadas logo após a manipulação (em até 2 horas) e 48 horas após a manipulação levando-se em consideração diferentes condições de armazenamento. Para as amostras avaliadas no tempo “0 h” de manipulação não houve avaliação de condições de armazenamento, pois os testes foram realizados logo após a manipulação das NP. Já para as amostras avaliadas no tempo “48 h” foram aplicadas as condições de fotoproteção, fotoexposição, e de temperatura de armazenamento. Os resultados podem ser vistos nos Gráficos 1A a 1B. O ensaio ocorreu em triplicata e para obtenção do “Fator de Indução” foi usado o seguinte cálculo:

$$\text{Fator de Indução} = \frac{[\text{n}^\circ \text{ de centros infecciosos}_{\text{tratado}} / (\text{n}^\circ \text{ de sobreviventes}_{\text{tratado}} + \text{n}^\circ \text{ de centros infecciosos}_{\text{tratado}})]}{[\text{n}^\circ \text{ de centros infecciosos}_{\text{n}^\circ\text{-tratado}} / (\text{n}^\circ \text{ de sobreviventes}_{\text{n}^\circ\text{-tratado}} + \text{n}^\circ \text{ de centros infecciosos}_{\text{n}^\circ\text{-tratado}})]}$$

Gráfico 1A: Resultado do Induteste para NPV nos diferentes tempos após preparo e condições de armazenamento. Os resultados individuais de fator de indução foram divididos pelo fator de indução do espontâneo, para melhor visualização. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p=0,0004$, resultado significativo tendo como referência $p<0,05$.



Onde: ref = refrigeração; s/foto = sem fotoproteção; e c/foto = com fotoproteção

No gráfico 1A, “Induteste para NPV”, as amostras de NP têm seus fatores de indução comparados com o fator de indução da luz UVC, potente indutor de centros infecciosos. A NPV 0 h chega a ser 100 vezes mais indutora que o nível de indução espontânea. É importante salientar que um resultado é considerado positivo quando o fator de indução é igual, ou maior, que 2,0. Após 48 horas de manipulação, com o aumento da temperatura há aumento no fator de indução da NPV. Quando se faz uso de fotoproteção este fator de indução é reduzido. Neste experimento destacam-se a “NPV 0 h”, que é 100 vezes maior que o nível espontâneo e 100 vezes menor que o nível da UVC, e a “NPV 48 h 37°C s/foto”, condição de armazenamento onde é mantido alto o fator de indução da NPV, comparado com as outras amostras.

A tabela 1 indica a sobrevivência celular à exposição à amostra NPV. Usando a UVC como referência de agente altamente genotóxico pode-se obter uma acentuada redução no nível de sobreviventes ao agente. Para as demais amostras não há queda considerável da sobrevivência, o que mostra que a NPV tem atividade genotóxica, porém não é letal para a célula como o UVC.

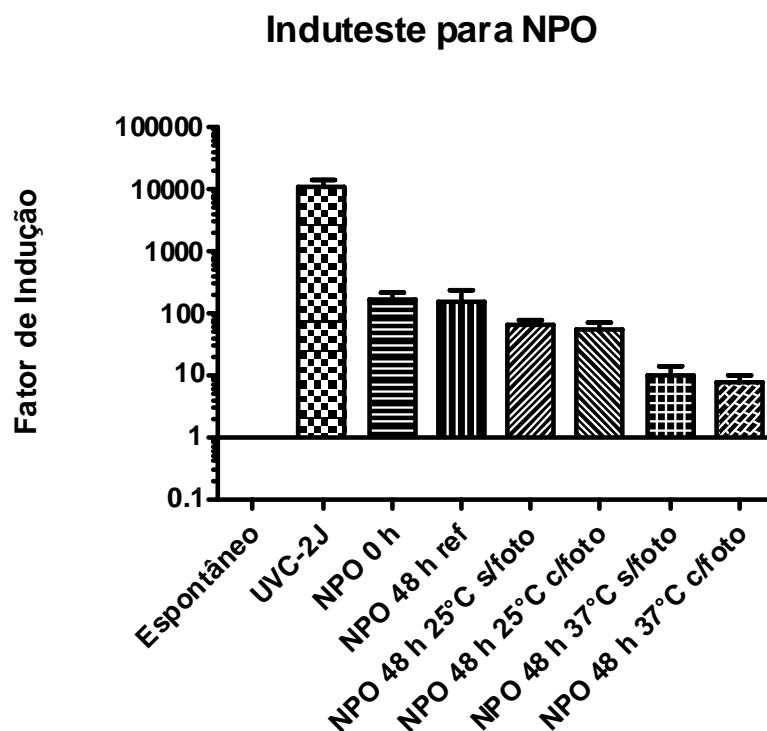
Tabela 1: Resultado da Sobrevivência bacteriana no Induteste para NPV e NPO nas diferentes condições de armazenamento.

<i>INDUTESTE PARA NP – Viabilidade celular</i>			
<i>Amostra</i>	<i>Sobrevivência (%)</i>	<i>Amostra</i>	<i>Sobrevivência (%)</i>
Espontâneo	100	Espontâneo	100
UVC-2J	14,4	UVC-2J	12,1
NPV 0 h	56,1	NPO 0 h	71,7
NPV 48 h ref	86,2	NPO 48 h ref	81,1
NPV 48 h 25°C s/foto	88,6	NPO 48 h 25°C s/foto	83,9
NPV 48 h 25°C c/foto	90,7	NPO 48 h 25°C c/foto	94,7
NPV 48 h 37°C s/foto	80,5	NPO 48 h 37°C s/foto	95,2
NPV 48 h 37°C c/foto	81,7	NPO 48 h 37°C c/foto	108,0

Onde: ref = refrigeração; s/foto = sem fotoproteção; e c/foto = com fotoproteção

No gráfico 1B, “Induteste para NPO”, as amostras de NP têm seus fatores de indução comparados com o fator de indução da luz UVC, potente indutor de centros infecciosos (indução de SOS).

Gráfico 1B: Resultado do Induteste para NPO nos diferentes tempos após preparo e condições de armazenamento. Os resultados individuais de fator de indução foram divididos pelo fator de indução do espontâneo, para melhor visualização. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p < 0,0001$, resultado significativo tendo como referência $p < 0,05$.



Onde: ref = refrigeração; s/foto = sem fotoproteção; e c/foto = com fotoproteção

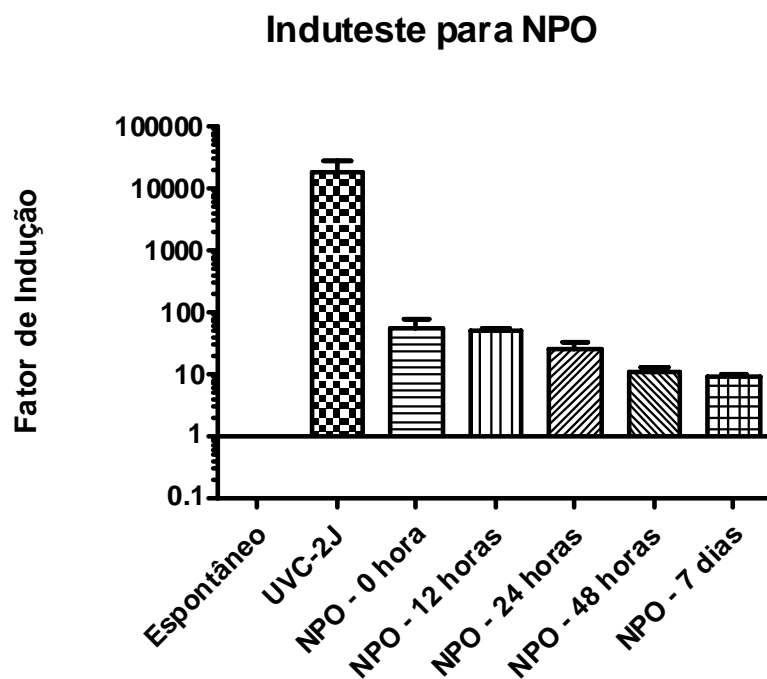
A NPO “0 hora” chega a ser 100 vezes mais indutora que o nível de indução espontânea. Após 48 horas de manipulação, com o aumento da temperatura há uma queda no fator de indução da NPO. O uso de fotoproteção influencia não significativa no fator de indução da amostra, com $p > 0,05$. Neste experimento destacam-se a “NPO 0 h”, que é 100 vezes maior que o nível espontâneo e 100 vezes menor que o nível da UVC, e a “NPO 48 h ref”, condição de armazenamento na qual é mantido o mesmo fator de indução da “NPO 0 h”.

Ainda na tabela 1, o índice de sobrevivência celular à exposição à amostra NPO foi avaliado. Usando a UVC como referência de agente altamente indutor pode-se obter acentuada redução no nível de sobreviventes ao agente. Para as demais amostras não há queda considerável

da sobrevivência celular, o que mostra que a NPO tem atividade genotóxica porém não é letal para a célula.

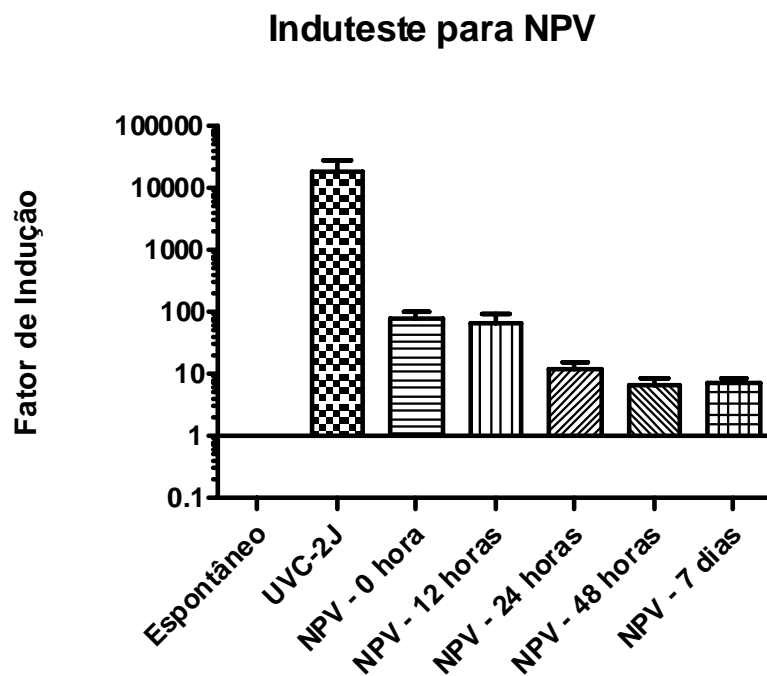
A fim de se avaliar se o tempo decorrido após o preparo da NP, armazenada sob refrigeração, influiria nessa atividade genotóxica foi realizado ensaio Induteste nos tempos 0 hora, 12 horas, 24 horas, 48 horas e 7 dias. Os resultados podem ser vistos nos Gráficos 2A e 2B.

Gráfico 2A: Resultado do Induteste para NPO nos diferentes tempos após preparo e armazenada sob refrigeração. Os resultados individuais de fator de indução foram divididos pelo fator de indução do espontâneo, para melhor visualização. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p < 0,05$, resultado significativo.



A NPO na 0 hora chega a ser 100 vezes mais indutora que o nível de indução espontânea. À medida que decorre o tempo após o preparo há ligeira queda no nível de indução, chegando à queda de uma ordem de grandeza após 48 horas.

Gráfico 2B: Resultado do Induteste para NPV nos diferentes tempos após preparo e armazenada sob refrigeração. Os resultados individuais de fator de indução foram divididos pelo fator de indução do espontâneo, para melhor visualização. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p < 0,05$, resultado significativo.



O resultado observado no Gráfico 2B é muito semelhante ao observado no 2A. A NPV na 0 hora chega a ser 100 vezes mais indutora que o nível de indução espontânea. À medida que decorre o tempo após o preparo há ligeira queda no nível de indução, chegando à queda de uma ordem de grandeza com 48 horas.

Na tabela 2, o índice de sobrevivência celular à exposição às amostras NPO e NPV foram avaliadas. Usando a UVC como referência de agente altamente tóxico pode-se obter acentuada redução no nível de sobreviventes ao agente. Para as demais amostras há crescimento da sobrevivência celular, o que mostra que as NP testadas tem atividade genotóxica, porém não são letais para a célula como o UVC.

Tabela 2: Resultado da Sobrevivência bacteriana no Induteste para NPV e NPO no decorrer do tempo após o preparo.


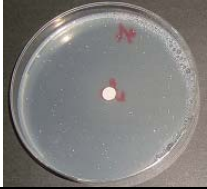










<i>INDUTESTE PARA NP – Viabilidade celular</i>			
<i>Amostra</i>	<i>Sobrevivência (%)</i>	<i>Amostra</i>	<i>Sobrevivência (%)</i>
Espontâneo	100	Espontâneo	100
UVC-2J	11,2	UVC-2J	11,2
NPV 0 hora	115,5	NPO 0 hora	121,1
NPV 12 horas	121,6	NPO 12 horas	134,3
NPV 24 horas	137,2	NPO 24 horas	124,2
NPV 48 horas	128,8	NPO 48 horas	113,1
NPV 7 dias	151,5	NPO 7 dias	138,3

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram crescimento bacteriano maior que ao nível de espontâneo. O caráter nutricional da amostra leva a um ambiente rico para a proliferação bacteriana.

4.3 TESTE DE AMES

O teste de Ames realizado na forma de “spot test” teve por objetivo realizar uma triagem das amostras quanto à mutagenicidade associada. As amostras, NPO e NPV foram aplicadas logo após a manipulação, não sendo avaliadas condições de armazenamento. Neste ensaio não houve tratamento prévio da bactéria com as amostras de NP, realizando-se apenas uma avaliação aguda dessas amostras em duplicata e comparando-se os resultados com o controle positivo (4-NQO). Os resultados encontram-se no Quadro 8 a seguir.

Quadro 8: Resultado do teste de Ames, “spot test”, realizado com as amostras NPO e NPV, comparando os resultados com o controle positivo 4-NQO. A avaliação negativa revela que o composto em teste não apresenta caráter mutagênico pelo teste, nas condições de ensaio.

CEPAS	CONTROLE POSITIVO	NPO		NPV	
		RESULTADO	AVALIAÇÃO	RESULTADO	AVALIAÇÃO
TA 97			Negativa		Negativa
TA 98			Negativa		Negativa
TA 100			Negativa		Negativa
TA 102			Negativa		Negativa

Os resultados do teste de Ames sugerem que as amostras de NP não apresentam caráter mutagênico, nas condições avaliadas, quando comparadas com o controle positivo. A ausência de halo nas placas contendo as amostras também revela que as NP não apresentam citotoxicidade.

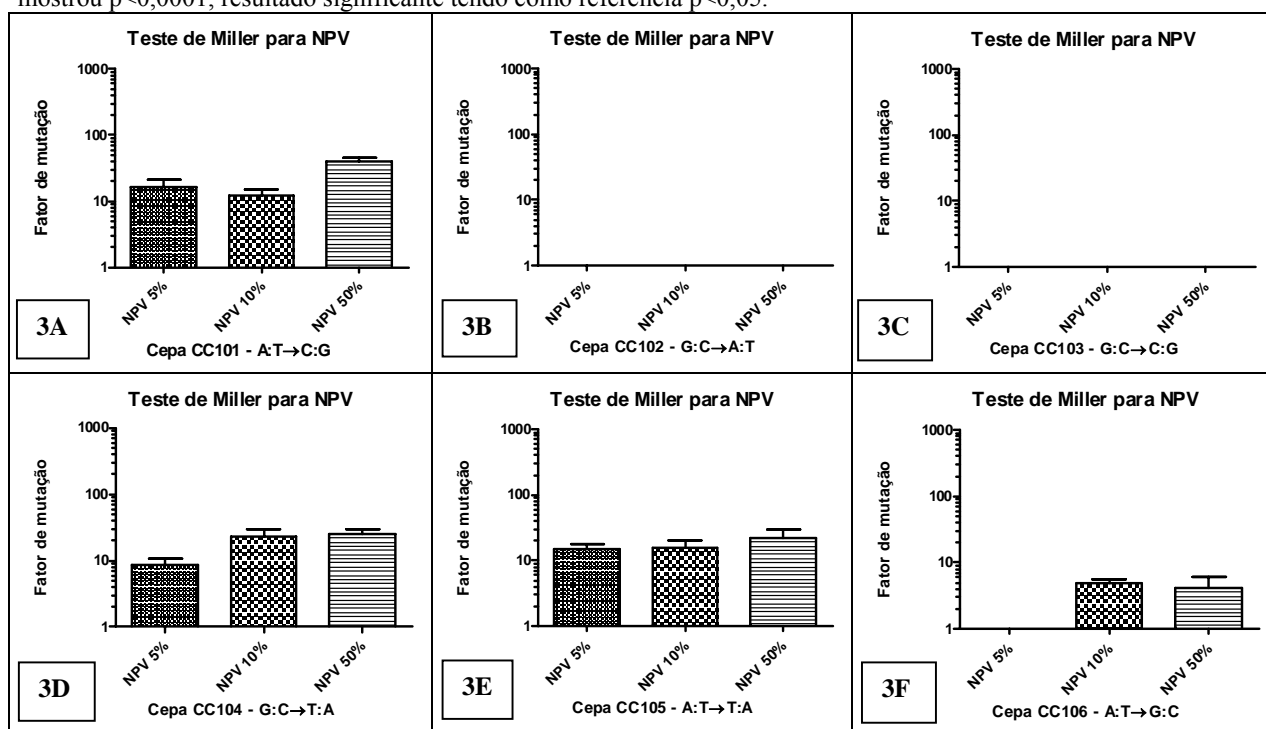
4.4 TESTE DE MILLER

Para o teste de Miller as amostras foram avaliadas imediatamente após o preparo, sem passar por condições de armazenamento. Os ensaios foram feitos em quintuplicata e os resultados

devem revelar o mecanismo mutagênico envolvido com o dano genético evidenciado nos ensaios SOS cromoteste e Induteste. Para NPV a condição utilizada foi armazenamento a 37°C, sem fotoproteção (NPV 48 h 37°C s/foto), para a NPO a condição utilizada foi armazenamento sob refrigeração (NPO 48 h ref), e para a NPS a condição utilizada foi armazenamento sob refrigeração. Nos Gráficos 3A-F seguem os resultados das formulações 3:1 testadas, contendo vitaminas ou elementos traço. Para obtenção do “Fator de Mutação” foi usado o seguinte cálculo:

$$\text{Fator de Mutação} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de revertentes em lactose}_{\text{tratados}} / \text{título em glicose}_{\text{tratados}})}{(\text{n}^\circ \text{ de revertentes em lactose}_{\text{não-tratados}} / \text{título em glicose}_{\text{não-tratados}})}$$

Gráficos 3A-F: Resultado do teste de Miller para NPV. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p < 0,0001$, resultado significativo tendo como referência $p < 0,05$.

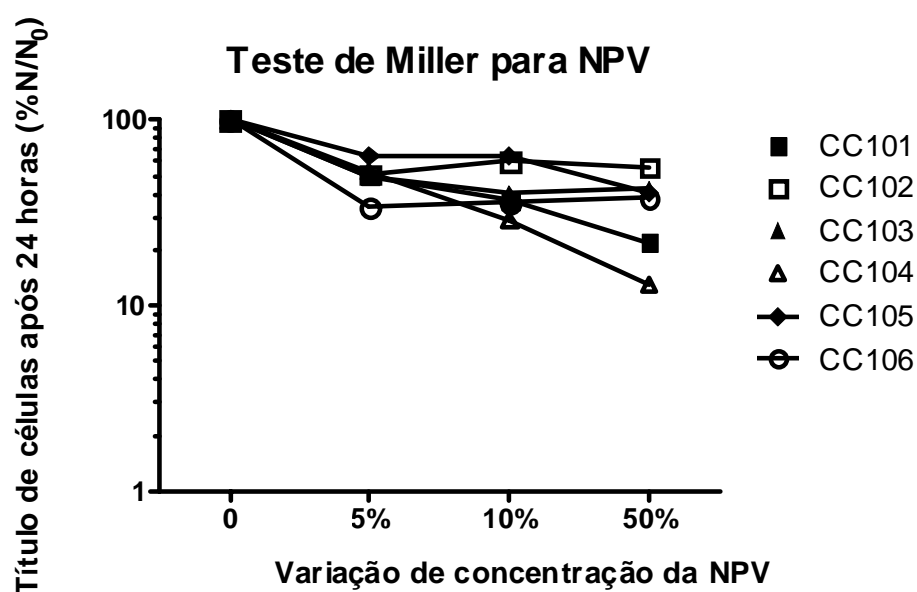


Nos gráficos 3B e 3C as cepas CC102 e CC103 não apresentaram evidências de reversão, contrastando com os resultados apresentados pelas cepas CC101, CC104, CC105 e CC106, gráficos 3A, 3D, 3E e 3F, respectivamente. Os resultados apontam para evidente

atividade mutagênica envolvendo dano oxidativo ao DNA associado à NPV, com as específicas trocas de bases bem caracterizadas.

O gráfico 3G mostra o resultado do desenvolvimento celular durante 24 horas de exposição à amostra de NP.

Gráfico 3G: Resultado do título de células, após 24 horas de exposição às NP, das cepas CC101-106 para NPV.

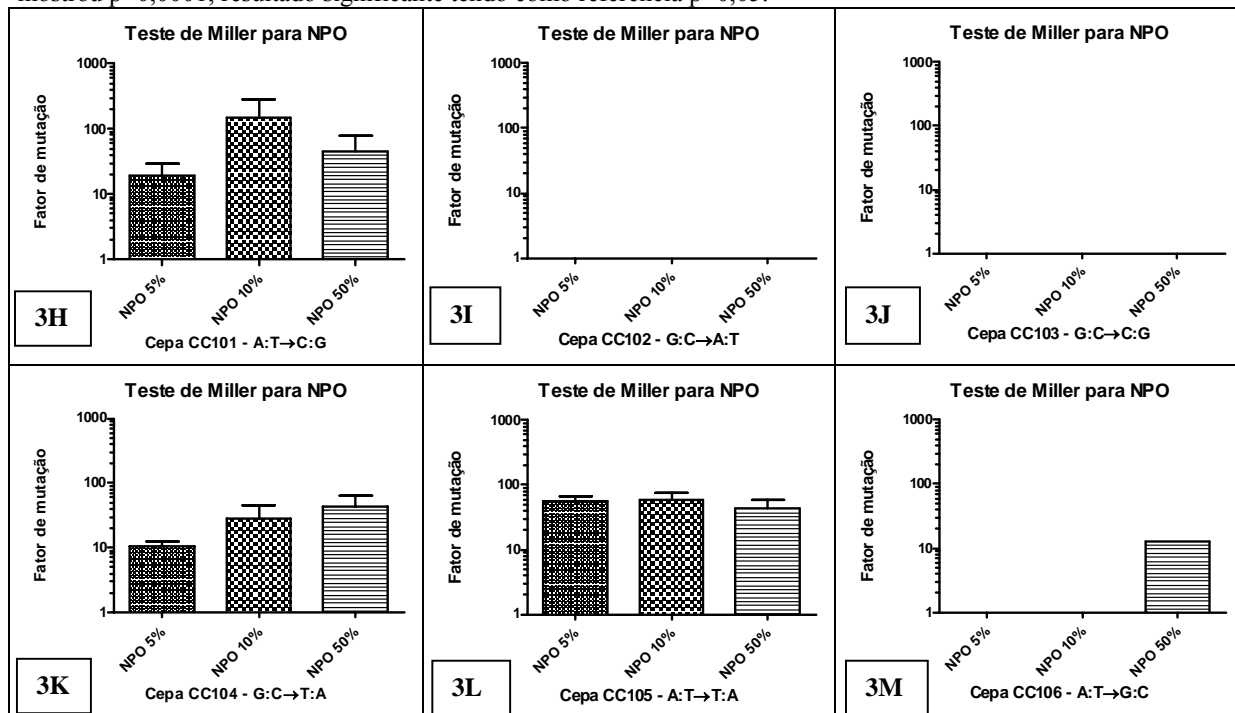


O ligeiro decaimento na taxa de crescimento celular apresentado não revela morte celular, podendo ser justificado pela menor quantidade de meio de cultura presente na mistura NP+MMM-glicose à medida que se aumenta a concentração da NP.

Para NPO os resultados são semelhantes aos da avaliação da NPV. Nos gráficos 3I e 3J as cepas CC102 e CC103 não apresentaram evidências de reversão, contrastando com os resultados apresentados pelas cepas CC101, CC104, CC105 e CC106, gráficos 3H, 3K, 3L e 3M,

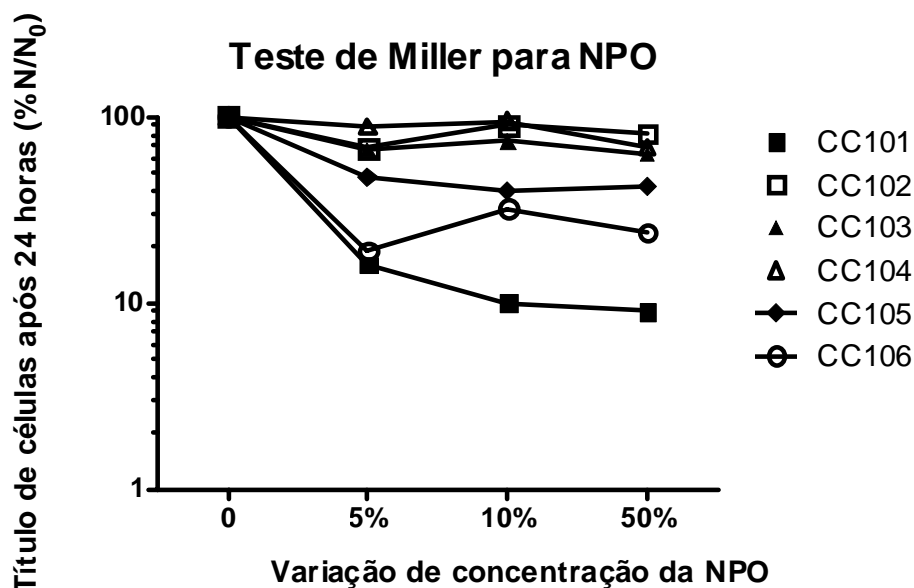
respectivamente. Os resultados apontam para evidente atividade mutagênica envolvendo dano oxidativo ao DNA associado à NPO, com as específicas trocas de bases bem caracterizadas.

Gráficos 3H-M: Resultado do teste de Miller para NPO. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p < 0,0001$, resultado significativo tendo como referência $p < 0,05$.



O gráfico 3N, a seguir, mostra o resultado do desenvolvimento celular durante 24 horas de exposição à amostra de NP.

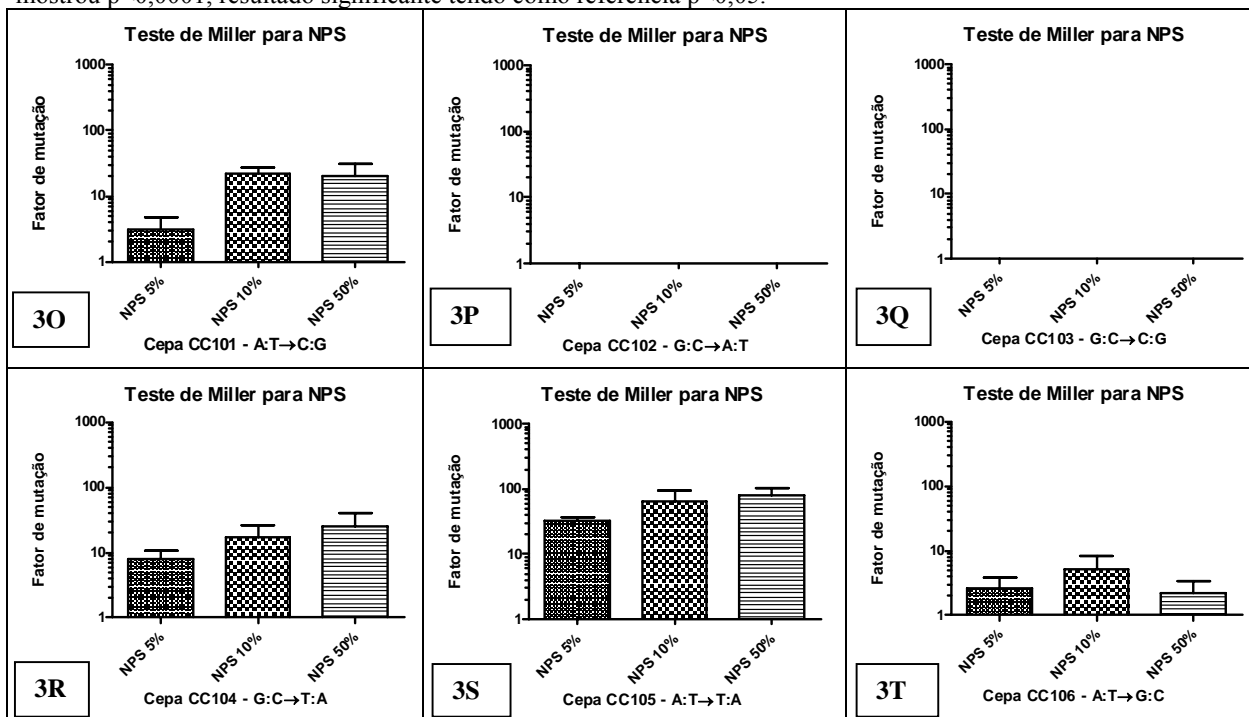
Gráfico 3N: Resultado do título de células, após 24 horas de exposição às NP, das cepas CC101-106 para NPO.



Da mesma forma que para NPV, o ligeiro decaimento na taxa de crescimento celular apresentado não revela morte celular, podendo ser justificado pela menor quantidade de meio de cultura presente na mistura NP+MMM-glicose à medida que se aumenta a concentração da NP.

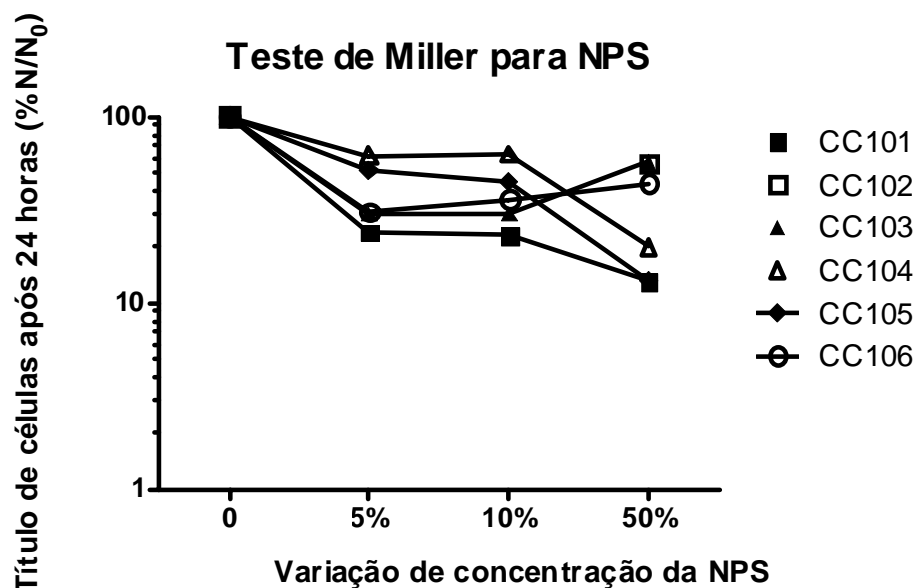
Para NPS os resultados são semelhantes aos da avaliação da NPV e da NPO. Nos gráficos 3P e 3Q as cepas CC102 e CC103 não apresentaram evidências de reversão, contrastando com os resultados apresentados pelas cepas CC101, CC104, CC105 e CC106, gráficos 3O, 3R, 3S e 3T, respectivamente. Os resultados apontam para evidente atividade mutagênica envolvendo dano oxidativo ao DNA associado à NPS, com as específicas trocas de bases bem caracterizadas.

Gráficos 3O-T: Resultado do teste de Miller para NPS. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p < 0,0001$, resultado significante tendo como referência $p < 0,05$.



O gráfico 3U, a seguir, mostra o resultado do desenvolvimento celular durante 24 horas de exposição à amostra de NP.

Gráfico 3U: Resultado do título de células, após 24 horas de exposição às NP, das cepas CC101-106 para NPS.



Novamente, o resultado do título de células para NPS não apresenta evidência de morte celular, assim como ocorre para NPO e NPV.

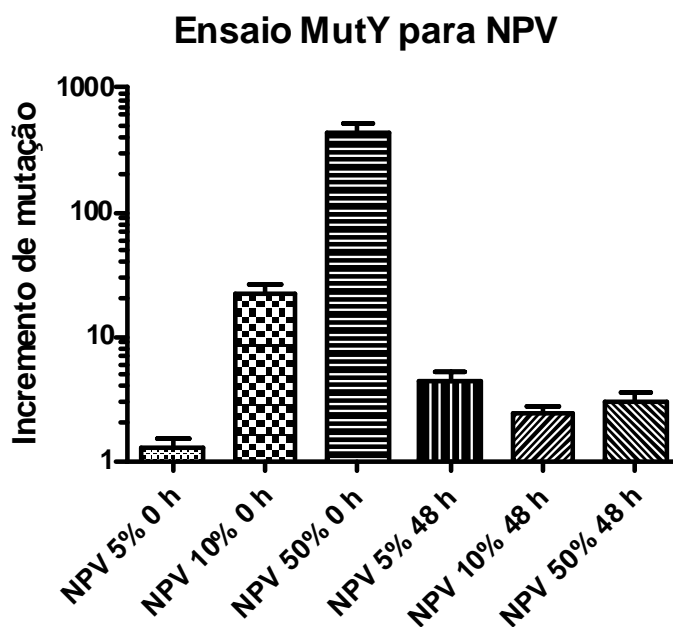
4.5 ENSAIO COM CEPA DEFICIENTE EM *mutY*

Para os ensaios com a cepa deficiente em *mutY* foram usadas as duas formulações base, NPO e NPV. Estas foram avaliadas logo após a manipulação (em até 2 horas) e 48 horas após a manipulação. Para as amostras avaliadas no tempo “0 h” de manipulação não houve adição de condições de armazenamento. Já para as amostras avaliadas no tempo “48 h” foram aplicadas as condições de armazenamento que mantiveram o maior fator de indução obtido no Induteste com as mesmas amostras. Para NPV a condição utilizada foi armazenamento a 37°C, sem fotoproteção (NPV 48 h 37°C s/foto), e para a NPO a condição utilizada foi armazenamento sob refrigeração (NPO 48 h ref). As amostras de NP foram diluídas para se obter concentrações

de 5%, 10% e 50% de NP no ensaio. Os resultados podem ser vistos nos Gráficos 4A a 4D. O ensaio ocorreu em quintuplicata e para obtenção do “Incremento de mutação” foi usado o seguinte cálculo:

$$\text{Incremento de mutação} = \text{Fator de Mutação}_{\text{CC104}} \times \text{Fator de Mutação}_{\text{CC104mutY}}$$

Gráfico 4A: Resultado do Ensaio com cepa MutY para NPV nos diferentes tempos após preparo e concentrações de amostra. Os resultados individuais de fator de mutação da cepa CC104 foram multiplicados pelo fator de mutação da cepa CC104mutY, para obter o incremento de mutação oxidativa de DNA. O fator de mutação da amostra é dividido pelo fator de mutação espontâneo para melhor visualização dos resultados. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p < 0,0001$, resultado significativo tendo como referência $p < 0,05$.

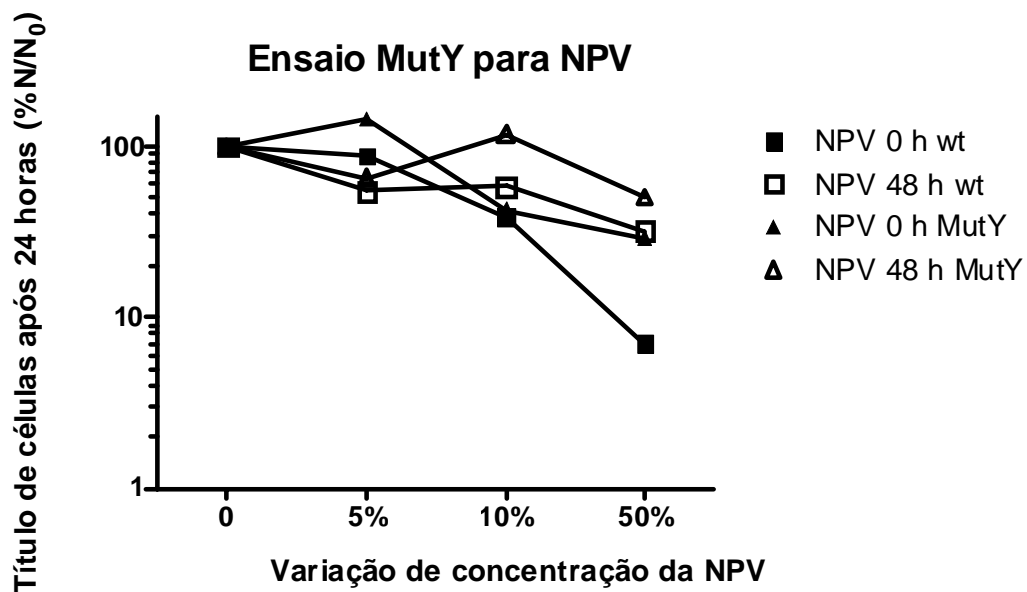


No gráfico 4A, “Ensaio MutY para NPV”, as amostras de NP têm seus fatores de mutação comparados entre as diferentes concentrações, no tempo “0 h” e no tempo “48 h”. No tempo “0 h” à medida que se aumenta a concentração é aumentado o incremento de mutação oxidativa do DNA, chegando a quase 1000 vezes o valor do espontâneo (os resultados mostrados no gráfico são nivelados pelo resultado do espontâneo). Após 48 horas de manipulação o ensaio revela um considerável decréscimo no incremento de mutação, que não mostra relação com a concentração da amostra. Neste experimento destacam-se a “NPV 50% 0 h”, que é quase 1000

vezes maior que o nível espontâneo, e a “NPV 5% 48 h” que tem considerável aumento de incremento de mutação oxidativa de DNA se comparado com a mesma diluição em “0 h”. De qualquer modo, em quase todas as situações há considerável atividade mutagênica envolvida.

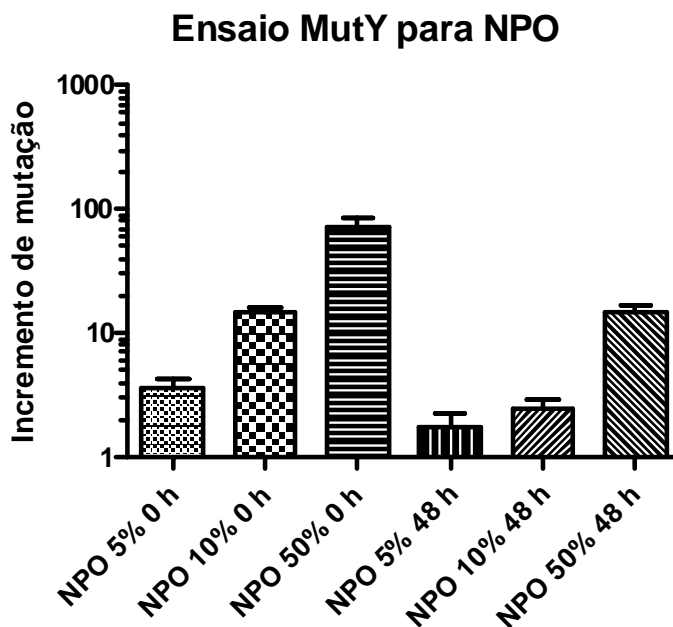
No Gráfico 4B podem ser vistos os resultados de sobrevivência das cepas CC104 e CC104*mutY* no “Ensaio mutY para NPV”. Uma ligeira queda no número de sobreviventes acompanha o aumento na concentração da amostra, para as duas cepas nos diferentes tempos.

Gráfico 4B: Resultado do título de células, após 24 horas de exposição às NP, das cepas CC104 (wt) e CC104*mutY* (mutY) para NPV nos diferentes tempos de preparo.



No gráfico 4C, “Ensaio mutY para NPO”, as amostras de NP têm seus incrementos de mutação comparados entre as diferentes concentrações, no tempo “0 h” e no tempo “48 h”.

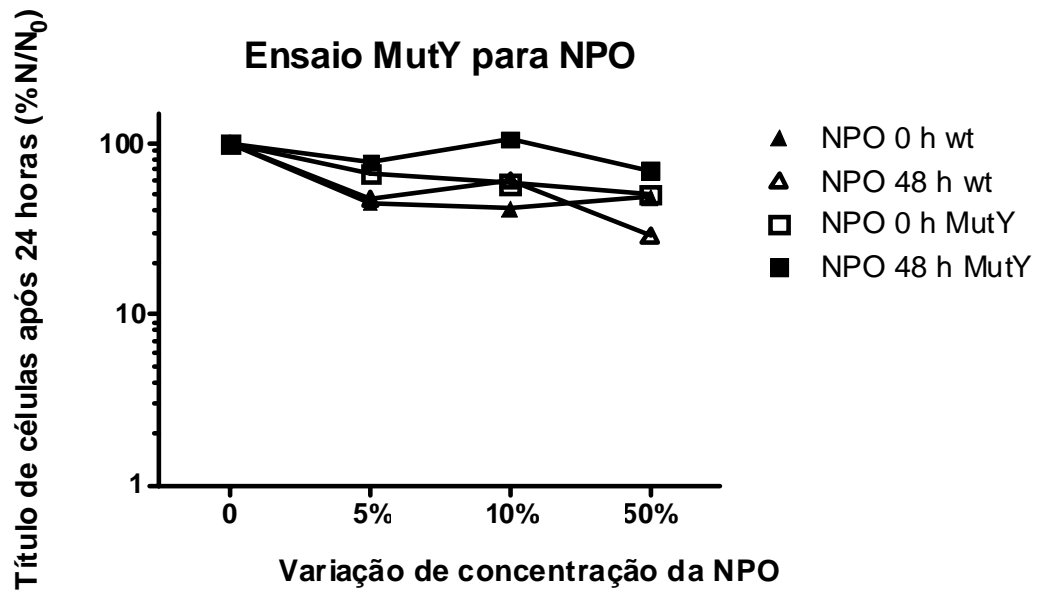
Gráfico 4C: Resultado do Ensaio com cepa MutY para NPO nos diferentes tempos após preparo e concentrações de amostra. Os resultados individuais de fator de mutação da cepa CC104 foram multiplicados pelo fator de mutação da cepa CC104*mutY*, para obter o incremento de mutação oxidativa de DNA. O fator de mutação da amostra é dividido pelo fator de mutação espontâneo para melhor visualização dos resultados. A análise estatística pelo método “One-Way ANOVA” mostrou $p < 0,0001$, resultado significativo tendo como referência $p < 0,05$.



No tempo “0 h” à medida que se aumenta a concentração é aumentado o incremento de mutação oxidativa do DNA, chegando a quase 100 vezes o valor do espontâneo (os resultados mostrados no gráfico são normalizados pelo resultado do espontâneo). Após 48 horas de manipulação o ensaio revela um considerável decréscimo no incremento de mutação, que mantém uma relação de aumento do fator mutagênico com o aumento da concentração da amostra. Neste experimento destacam-se a “NPO 50% 0 h”, que é quase 100 vezes maior que o nível espontâneo, e a “NPO 50% 48 h” que mantém considerável incremento de mutação oxidativa de DNA e uma proporcionalidade com a amostra no tempo “0 h”. De qualquer modo, em quase todas as situações há considerável atividade mutagênica envolvida.

No Gráfico 4D podem ser vistos os resultados de sobrevivência das cepas CC104 e CC104*mutY* no “Ensaio mutY para NPO”. Uma discreta queda no número de sobreviventes acompanha o aumento na concentração da amostra, para as duas cepas nos diferentes tempos.

Gráfico 4D: Resultado do título de células, após 24 horas de exposição às NP, das cepas CC104 (wt) e CC104*mutY* (*mutY*) para NPO nos diferentes tempos de preparo.



5 DISCUSSÃO

A avaliação da atividade genotóxica e mutagênica de formulações 3:1 de NP voltadas para neonatos prematuros neste trabalho foi realizada através de ensaios microbiológicos que são utilizados rotineiramente na avaliação toxicológica de substâncias para uso humano.

É indiscutível a importância da TNP no aumento da sobrevivência de neonatos prematuros (JONAS e ZIEGLER, 1998) e a implantação da técnica nutricional logo após o nascimento (LABORIE *et al.*, 1998), com considerável ganho nutricional associado à diminuição de riscos infecciosos e metabólicos (DUPERTUIS *et al.*, 2002), com a aplicação de formulações 3:1 (DRISCOLL *et al.*, 2003). Por outro lado, o uso de NP em neonatos prematuros para TN tem sido constantemente associado a diversos efeitos tóxicos, principalmente colestase hepática (HONG *et al.*, 2007), devido ao longo uso da TNP.

A evolução das formulações de TNP ao longo das últimas 5 décadas tem sido de suma importância para minimizar os riscos associados (VINNARS e WILMORE, 2003), principalmente no que concerne à estabilidade e compatibilidade entre os itens de uma formulação completa de NP (DRISCOLL, 2005). Ensaio físico-químicos realizados na Universidade Federal do Rio de Janeiro (RIBEIRO, 2007; LOBO, 2005) mostraram formulações físico-quimicamente estáveis por até 72 horas, sendo avaliados fatores como estabilidade de emulsão lipídica, estabilidade de vitaminas e formação de peróxidos. Este último de vital importância, pois tem se mostrado responsável pelos danos hepáticos associados ao uso da NP (CHESSEX *et al.*, 2001a). Os peróxidos podem ser produzidos de diversas maneiras dentro de uma formulação 3:1 (LAVOIE e CHESSEX, 1997) e são responsáveis por diversas doenças em neonatos prematuros (DANI *et al.*, 2004), que são sensivelmente predispostos ao estresse oxidativo (O'DONOVAN e FERNANDES, 2000) associado ao seu delicado, e imaturo, sistema de defesa antioxidante (CAI *et al.*, 2006).

Levando em consideração que a infusão de peróxidos nestes pacientes particularmente expostos à sua ação danosa é considerada de risco biológico (LABORIE *et al.*, 1998) e que lesões oxidativas no DNA podem ser causadas pelos peróxidos infundidos (GAO *et al.*, 2004), podendo tornar-se mutações (ANISIMOV, 2002), a necessidade de investigação da atividade genotóxica e/ou mutagênica da NP voltada para estes neonatos é extremamente importante.

Os resultados obtidos em testes preliminares deste projeto apontaram para uma atividade genotóxica associada à NP. Para uma investigação mais detalhada, foi desenhado, então, um protocolo de investigação (Esquema 2 – página 48) que contempla a avaliação de diferentes amostras de NP sob diferentes tempos de preparo e condições de armazenamento em 5 ensaios microbiológicos: SOS cromoteste, Induteste, Teste de Miller, ensaio com cepas deficientes em reparo de lesão oxidativa e Teste de Ames.

Dentre os ensaios realizados neste trabalho destaca-se, inicialmente, o “SOS cromoteste”, teste qualitativo que busca a caracterização do item relevante para a atividade genotóxica da NP 3:1. Os resultados mostrados nos Quadros 7A e 7B indicam que, com exceção da solução de aminoácidos, os itens separadamente não promovem resposta SOS nas cepas *E. coli* PQ35 e PQ37 utilizadas no ensaio. Certos aminoácidos, como L-histidina e L-cisteína (Quadro 5 – página 44), promovem sensibilização bacteriana, especialmente na presença de glicose, podendo causar forte resposta a peróxido de hidrogênio (ALHAMA *et al.*, 1998) no SOS cromoteste. Por este motivo, as formulações que não possuem aminoácidos, NP1 e NP2, não apresentam resposta visível ao teste, ao contrário do teste com os aminoácidos isolados. Contudo, não pode ser descartado que formulações 3:1 tenham atividade genotóxica, pois as interações entre os componentes, entre eles aminoácidos, glicose, lipídios, vitaminas e oligoelementos, promovem diversas reações que levam à geração de peróxidos (LABORIE *et al.*, 1998). O

resultado do ensaio SOS cromoteste indica que, além de potencialmente genotóxicas, as formulações NPO e NPV (Quadro 7A – página 60) não levam à morte celular, ao contrário do composto padrão positivo 4-NQO (Quadro 7B – página 60). Isso pode ser um indício de que a atividade genotóxica possa levar à herança mutacional do dano genético causado pelas formulações testadas (QUILLARDET e HOFNUNG, 1985). De qualquer modo, o uso de formulações 3:1 é fundamentado na infusão de elementos que são de fundamental importância para o desenvolvimento de neonatos prematuros e que não devem ser dispensados da TNP, sendo indiscutível a aplicabilidade dessas misturas.

Em seguida ao SOS spot teste, após a comprovação qualitativa da atividade genotóxica das diferentes formulações 3:1 (NPO e NPV), o “Induteste” teve como objetivo avaliar se condições de armazenamento que têm relação conhecida com a estabilidade físico-química da NP, como tempo de preparo (RIBEIRO, 2007), temperatura de armazenamento (DRISCOLL *et al.*, 2001) e fotoexposição (ALLWOOD, 2002), poderiam influenciar na atividade genotóxica das amostras em teste. Os resultados, vistos nos Gráficos 1A (Página 62) a 1B (Página 64), indicam que há influência dessas condições na genotoxicidade das NP. Num primeiro instante, as amostras “NPV 0 h” (Gráfico 1A) e “NPO 0 h” (Gráfico 1B), mostraram similar fator de indução, cerca de 100 vezes o nível de indução espontâneo para ambos. Isso vai de encontro aos resultados obtidos no SOS cromoteste. Levando-se em consideração o avanço do tempo após preparo e a possibilidade de ocorrer maior quantidade de reações, principalmente as de degradação de elementos da mistura levando a subprodutos (tóxicos ou não), há uma certa surpresa ao se observar os resultados obtidos após 48 horas de manipulação nas diferentes condições de armazenamento. Em quase todos eles, onde a tendência seria a de aumento da atividade genotóxica, houve redução da atividade. A exceção foi a condição “NPO 48 h ref” (Gráfico 1B), onde foi mantido o nível de atividade genotóxica da “NPO 0 h”. As reações

envolvidas na formação, ou degradação, de compostos genotoxicamente ativos na formulação ocorrem com menor velocidade em temperatura refrigerada (DRISCOLL *et al.*, 2001), o que, com o aumento da temperatura independente da fotoproteção, não pode ser observado nas outras condições de armazenamento dessa formulação, levando a uma diminuição gradativa da atividade genotóxica (Gráfico 1B). Já para a formulação NPV é observado o inverso. O resfriamento leva à acentuada queda no fator de indução da mistura, o que também é associado à fotoproteção independentemente do aumento da temperatura. Nesse caso parece haver direta relação entre temperatura e exposição à luz, pois à medida que se aumenta a temperatura sem fotoproteção há aumento da atividade genotóxica da formulação. A luminosidade no ato da manipulação pode ser fator significativo no alto fator de indução observado em “0 h”. Como são compostos que se degradam facilmente, o nível de peróxidos produzidos inicialmente não é mantido sob refrigeração por diminuição da velocidade das reações. Porém, à medida que se aumenta a temperatura e se promove a fotoexposição, ocorre maior produção de peróxidos (KHASHU *et al.*, 2006). Os Gráficos 2A (Página 65) e 2B (Página 66) mostram os resultados da avaliação de genotoxicidade associada a tempo após o preparo das NP. Para ambas as amostras o que se observa nos Gráficos 1A e 1B no que se refere à condição de armazenamento em refrigeração é mostrado numa escala de evolução de tempo. Pelo menos até 24 horas após o preparo, para a NPV não se observa alteração significativa do caráter genotóxico. Este decai de uma ordem de grandeza o Fator de Indução a partir de 48 horas após o preparo. Para a NPO este decaimento só é observado na avaliação feita no 7º dia após o preparo. Tem-se, então, a manutenção do caráter genotóxico por no mínimo 24 horas após o preparo quando as NP são armazenadas segundo as recomendações da legislação brasileira vigente (ANVISA-BRASIL, 1998).

Os trabalhos realizados por Lobo (LOBO, 2005) e Ribeiro (RIBEIRO, 2007) com a mesma formulação aqui em teste (NPV), sob as mesmas condições de temperatura e

fotoexposição revelaram que não há alteração no índice de peróxido relevante com o aumento da temperatura, mas há degradação de vitamina C em 48 horas (RIBEIRO, 2007). Estes resultados podem colaborar para o entendimento do que ocorre na NPV 48 h 37°C s/foto (Gráfico 1A), na qual há o aumento do fator de indução no Induteste. Nesse caso, a degradação da vitamina C tem relação direta com a produção de peróxidos na NP (KNAFO *et al.*, 2005).

Para concluir o Induteste, as tabela 1 (Página 63) e 2 (Página 67) indicam os resultados de sobrevivência das cepas associada à exposição às diferentes amostras de NP e ao UVC em diferentes condições de armazenamento e tempo após o preparo, respectivamente. Não há morte celular evidenciada na exposição às NP, comparado com o indutor padrão UVC. Com isso, novamente, o teste microbiológico mostra que as células alvo de resposta SOS, no Induteste, sobrevivem ao dano genético causado pela NP, permitindo, possivelmente, a transmissão deste às células das gerações seguintes sob a forma de mutação (MOREAU *et al.*, 1976).

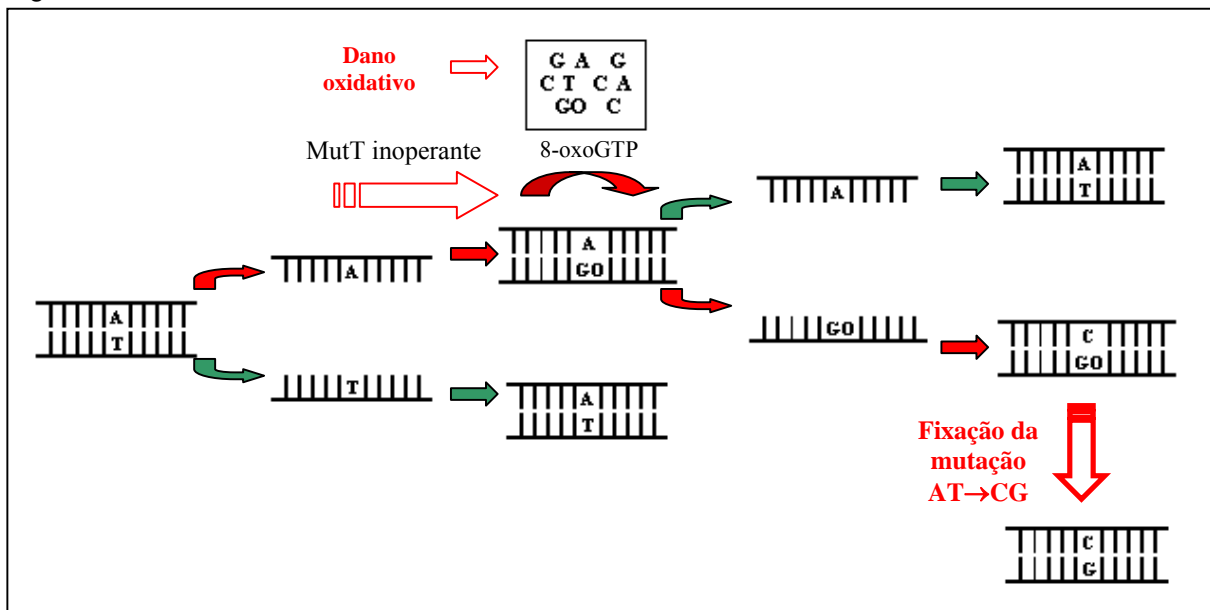
Os resultados do teste de Ames, na sua forma qualitativa para triagem, não indicaram resultado positivo para mutagenicidade, quando comparados com o controle positivo 4NQO. Neste ensaio não foi aplicado qualquer pré-tratamento da bactéria com as amostras testadas, sendo avaliada somente a ação aguda das misturas de NP. Dificuldades técnicas foram encontradas para realizar o teste, como a presença do aminoácido L-histidina na solução de aminoácidos das NP testadas levando a resultados inadequados. Com isso, não foi possível realizar o teste na sua forma quantitativa, o que poderia proporcionar resultados mais esclarecedores. De qualquer modo, estes resultados não descartam a atividade mutagênica relacionada à NP, na condição de teste. Segundo Ames em seu trabalho sobre esta modalidade de ensaio (MARON e AMES, 1983), um resultado negativo no “spot test” não é indicação suficiente da não mutagenicidade de um composto, assim como o resultado positivo também não é indicação suficiente de mutagenicidade, sem que estes resultados estejam associados a outras

modalidades de análise. Sendo assim, os resultados encontrados no SOS Cromoteste e no Induteste indicam tal atividade e incitam para avaliação em outra modalidade de análise. Neste sentido aplica-se às amostras a avaliação de mutagenicidade pelo teste de Miller (CUPPLES E MILLER, 1989).

O ensaio utilizando o gene *lacZ* como alvo, ou teste de Miller, usa uma bateria de cepas de *E. coli* mutantes em *lacZ*. Cada cepa carrega um alelo *lacZ* que codifica para uma β -galactosidase inativa. O uso de lactose como fonte de carbono pela bactéria requer a atividade dessa enzima, que catalisa a hidrólise de lactose a glicose e galactose. Assim, a reversão da mutação ($lacZ^- \rightarrow lacZ^+$) resulta em uma colônia que cresce em meio mínimo contendo lactose. Os alelos usados no teste de Miller foram racionalmente desenhados para que uma mutação por troca específica de um nucleotídeo no DNA permita o crescimento de um seletor mutante de cada alelo. Isso significa que este teste pode ser usado diretamente para testar a especificidade mutacional de um agente mutagênico, sem a necessidade do sequenciamento do DNA (JOSEPHY, 2000). Os Gráficos de 3A a 3M (Página 69) mostram os resultados do ensaio de Miller para a NPV e a NPO. Os Gráficos 3O a 3T (Página 73) mostram os resultados do ensaio de Miller para a NPS, formulação de NP sem adição de vitaminas e oligoelementos, indicando o mesmo perfil mutagênico das outras duas amostras testadas e a não relação destes elementos com aumento ou diminuição do caráter genotóxico das misturas. Quatro cepas mostraram-se revertentes na presença das amostras, revelando específicas trocas de base, e um mecanismo basicamente oxidativo de lesão do DNA, levando à fixação de mutações específicas. Das trocas de bases que ficam evidenciadas 3 são transversões ($AT \rightarrow CG$; $GC \rightarrow TA$; $AT \rightarrow TA$) e uma é transição ($AT \rightarrow GC$), envolvendo troca de bases de grupos diferentes e de mesmo grupo, respectivamente. A troca de base que ocorre na cepa CC101 sugere que o dano oxidativo (8-

oxoG) não ocorre somente na fita de DNA, mas também no pool de nucleotídeos a serem inseridos na fita, com conseqüente fixação dessa guanina oxidada ao DNA (Esquema 3 a seguir).

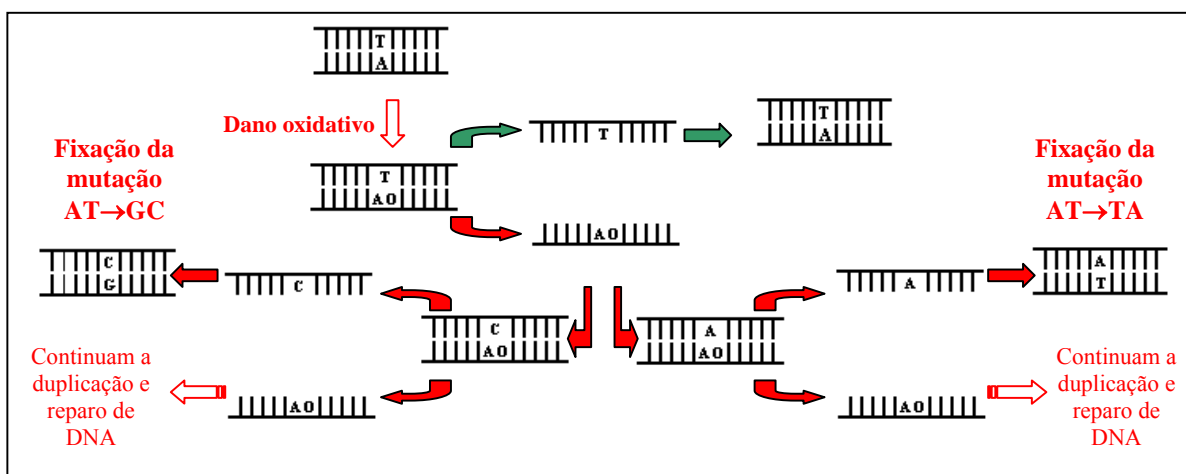
Esquema 3: Mecanismo de fixação da mutação AT→CG, tornando a cepa CC101 revertente para produção de β-galactosidase.



O dano mutacional causado pela 8-oxoG levando à reversão da cepa CC104 fica bem evidente no Esquema 2 (Página 48). Esta é uma das principais lesões oxidativas que ocorrem no DNA. O uso de cepa deficiente em MutY revela a especificidade dessa troca de base e a importância da manutenção dessa via de reparo. Ambas as amostras testadas, NPV e NPO, parecem causar tal lesão sem causar morte celular, o que poderia comprometer tecidos humanos a um longo prazo de exposição. Os freqüentes relatos de injúria tecidual hepática têm íntima relação com a ação de peróxidos presentes na NP e um dos mecanismos responsáveis pode ser relacionado ao estresse oxidativo do DNA (DRISCOLL *et al.*, 2009).

O mecanismo envolvendo as reversões das cepas CC105 e CC106 tem relação com a oxidação da adenina na fita de DNA, conforme Esquema 4, a seguir. A baixa taxa de reversão de CC106 revela a rota preferencial de troca de bases para a A→T, frente a A→G.

Esquema 4: Mecanismo de fixação das mutações AT→TA e AT→GC, tornando as cepas CC105 e CC106 revertentes para produção de β-galactosidase.



Objetivando confirmar que a genotoxicidade das amostras NPO e NPV tem correlação direta com dano oxidativo de DNA promovido por peróxidos das misturas 3:1 foi feito o “Teste com cepa MutY“. Esse teste, específico para mutação promovida por dano oxidativo do DNA, vem dar início à elucidação do mecanismo envolvido na genotoxicidade e, possivelmente, mutagenicidade das NP testadas. Para combater os efeitos biológicos deletéreos da presença de 8-oxoG, as células têm mecanismos especificamente desenvolvidos para remover essa lesão do DNA. O primeiro nível desta proteção é a MTH (MutT em *E. coli*), uma proteína com atividade pirofosfolidase (8-oxoGTPase). Essa enzima é responsável pela hidrólise de 8-oxoGTP. O segundo nível de defesa é/são específica(s) DNA glicosilase(s) que inicia(m) via de reparo por excisão de base (BER). A maior 8-oxoG glicosilase em *E. coli* é a proteína Fpg (MutM). A MutM retira preferencialmente a 8-oxoG quando ela está pareada com C, T ou G. O terceiro nível

é realizado pelas proteínas MYH (ou MutY em *E. coli*), que removem a adenina malpareada com 8-oxoG (OLINSKI *et al.*, 2007). O mecanismo de reparo (Esquema 1 – página 32) envolvido na eliminação de danos oxidativos de bases nitrogenadas, especialmente a 8-oxoG, tem na proteína MutY a última barreira contra a fixação do dano oxidativo (mutação GC→TA) (LOFT e POULSEN, 1996). A inativação dessa proteína leva à maior fixação mutacional do dano oxidativo (MICHAELS *et al.*, 1992), o que pode ser revelado com o uso desse teste específico para dano oxidativo. Como o resultado positivo é revelado por uma mutação específica, ele indica que a substância em teste é mutagênica e que o mecanismo envolvido é a oxidação do DNA e o resultado é dado como fator de mutagênese oxidativa de DNA. Para realização desse teste, além das amostras “NPO 0 h” e “NPV 0 h” que se mostraram bastante genotóxicas nos testes anteriores, foram usadas as amostras que no Induteste mostraram evidente atividade genotóxica após 48 horas de manipulação das misturas em determinadas condições de armazenamento, a “NPO 48 h ref” e a “NPV 48 h 37°C s/foto”. O objetivo era avaliar se o dano oxidativo era uma possível causa de genotoxicidade e se perdurava no tempo “48 h”. Além disso, foram feitas diluições das amostras de NP em 3 concentrações distintas visando avaliar uma correlação destas com os resultados. As bactérias ficam em contato com as amostras por 24 horas, tempo suficiente para que haja reparo e replicação de DNA, com fixação de mutações que levam à reversão de bactérias Lac⁻. Os resultados podem ser observados nos Gráficos 4A a 4D (Páginas 75 a 78). Os resultados das amostras “NPO 0 h” e “NPV 0 h” têm o mesmo padrão de fator de mutagênese, acompanhando o aumento da concentração, porém a “NPV 0 h” induz quase 1000 vezes mais mutações oxidativas que o espontâneo, e 10 vezes mais que a “NPO 0 h”. A presença de vitaminas tem forte influência nessa atividade mutagênica. Quanto maior a concentração da amostra maior a atividade mutagênica, sendo assim maior a concentração de

ERO na amostra. Passadas as 48 horas de manipulação o perfil mutagênico observado inicialmente, dependente da concentração da amostra “NPO 0 h”, é observado, numa escala pouco menor, na amostra “NPO 48 h ref”, confirmando o resultado encontrado no Induteste da amostra NPO (Gráfico 1B – página 64). Nesse resultado fica evidente que as ERO presentes na formulação NPO podem ter sido geradas em reações redox, tipo “Fenton/Haber-Weiss”, mediadas por metais como cobre ou cromo (VALKO *et al.*, 2006), presentes na solução de elementos traço (Quadro 4 – página 43). A menor temperatura pode retardar esse tipo de reação cíclica (BAL e KASPRZAK, 2002) e, assim, deixar a atividade mutagênica nivelada. Isso não ocorre na amostra “NPV 48 h 37°C s/foto”, onde após 48 horas não há correlação entre concentração e atividade mutagênica oxidativa de DNA. Da mesma forma que há a degradação de vitamina C em temperatura elevada, esta pode estar diretamente ligada ao consumo de ERO por diminuição do substrato para formação, ou, também, pela atividade antioxidante das outras vitaminas presentes no composto multivitamínico (Quadro 4) utilizado na formulação NPV. De qualquer forma, é evidente que há a atividade mutagênica e que essa está diretamente vinculada à presença de ERO nas formulações. Apesar da discreta diminuição do título celular com as amostras testadas neste ensaio (Gráfico 4B e 4D) este resultado indica que as amostras NPO e NPV possuem atividade mutagênica associada e que esta diminui com o passar do tempo em diferentes condições de armazenamento, conforme também visto no Induteste. O ensaio de Miller (Gráficos 3A a 3T) caracteriza bem o tipo de mutação que as NP causam ao DNA bacteriano.

Metais de transição como ferro e cobre catalisam a produção de radicais hidroxil na reação de Fenton (LOFT e POULSEN, 1996). A produção de radical hidroxil, nesta reação, envolve química metalo-redox, numa velocidade maior que na reação direta de radical superóxido com peróxido de hidrogênio, reação de Haber-Weiss (ANTHOLINE *et al.*, 1985). *In vitro*, concentrações farmacológicas de ácido ascórbico (vitamina C) medeiam seletiva toxicidade

celular via formação de radical ascorbato ($Asc^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio em células em meio de cultura. Concentrações de peróxido de hidrogênio $\geq 25 \mu M$ foram tóxicas a células cancerosas *in vitro* (CHEN *et al.*, 2007). Na presença de ferro, bem como de íons de metais traço, esses hidroperóxidos são transformados em ERO via reação de Fenton (LAVOIE e CHESSEX, 1997). Hidroperóxidos são reativos e podem formar radicais livres.

Tem sido mostrado um alto acúmulo de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxoG), o produto da hidroxilação de guanina no carbono 8. A 8-oxoG pode emparelhar com 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato ou com 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato durante a replicação do DNA, formando C*8-oxoG ou emparelhar uma substituição de bases com adenina (A*8-oxoG). O emparelhamento A*8-oxoG pode gerar uma transversão deletérea de C:G para A:T, causando instabilidade genômica. Conseqüentemente, polimorfismos que reduzem a expressão e/ou atividade de MYH tem sido associados com predisposição a certos tipos de câncer (GAO *et al.*, 2004). Em adição à 8-oxoG, outras lesões oxidativas, como 8-oxoadenina, 2-oxoadenina, 5-hidroxicitidina, etc., são conhecidamente mutagênicas e poderiam também contribuir para o aumento da mutagênese em bactérias deficientes em enzimas antioxidantes (ALHAMA *et al.*, 1998).

Os testes utilizados neste trabalho são de fundamental importância para elucidar os mecanismos envolvidos na atividade genotóxica e mutagênica das NP testadas. Os resultados revelam o perfil do potencial genotóxico e mutagênico da NP e permitirão indicar condições que levem a uma utilização mais segura das formulações 3:1 de NP em neonatos prematuros. O bom entendimento do mecanismo mutacional envolvendo oxidação do DNA permite prever possíveis conseqüências do tratamento de neonatos prematuros com polimorfismo genético de enzimas de reparo de DNA (NOHMI *et al.*, 2005).

6 CONCLUSÃO

Considerando o objetivo geral deste trabalho, “*Caracterizar o potencial genotóxico e mutagênico de misturas 3:1 de Nutrição Parenteral voltadas para pacientes neonatos utilizando testes rápidos em procariotos*”, os objetivos específicos, as amostras de NP avaliadas, os ensaios microbiológicos utilizados e os resultados encontrados pode-se concluir que:

- SOS cromoteste: As Amostras testadas apresentam caráter genotóxico quando em formulações 3:1 contendo vitaminas ou oligoelementos, sendo a mistura de aminoácidos importante para tal caráter;
- Induteste: As amostras testadas sob refrigeração apresentam caráter genotóxico mantido de 0 h a 24 h, apresentando redução a partir de 48 h. Quando há variação de condições de armazenamento as amostras armazenadas em temperatura 37°C e sob fotoexposição apresentaram os maiores índices de genotoxicidade;
- Teste de Ames: Não houve resultado positivo para as amostras testadas, porém não se pôde descartar o possível caráter mutagênico, devido a incompatibilidade entre amostra e condições de teste.
- Teste de Miller: As amostras testadas apresentam caráter mutagênico para 4 cepas (CC101, CC104, CC105 e CC106), sendo comprovado que a ausência de vitaminas ou oligoelementos na formulação não descarta o caráter mutagênico. O perfil mutagênico encontrado com as cepas utilizadas sugere fortemente a geração de estresse oxidativo, implicando a lesão 8-oxoG na origem das mutações induzidas.

7 RECOMENDAÇÕES

Vários polimorfismos de DNA glicosilases responsáveis por excisão de 8-oxoG são conhecidos. A sua presença em genomas humanos está ligada ao risco de desenvolvimento de tipos específicos de câncer. A hMYH glicosilase retira a adenina incorporada ao DNA em oposição a 8-oxoG por DNA polimerases replicativas, e assim tem uma função de corrigir erros replicativos. Sete diferentes polimorfismos do gene *hMYH* são conhecidos, a maioria associada a tumores colorretais (TUDEK, 2007). Quando o reparo de DNA é inibido, mutações em oncogenes e genes supressores de tumor ocorrem, promovendo carcinogênese (GAO *et al.*, 2004). A doença de Wilson e a Anemia de Fanconi são exemplos de doenças genéticas que expõem o DNA a mutações por dano oxidativo (LOFT e POULSEN, 1996). O uso de TNP contendo formulações 3:1 poderia elevar o risco de alterações genéticas em neonatos contendo tais hereditariedades.

Em longo prazo, não há dados estatísticos que revelem a influência da NP na qualidade de vida de adultos que tenham feito uso de NP por indicação de prematuridade. A exposição precoce a agentes mutagênicos pode levar a um adiantamento em eventos degenerativos relacionados à idade e, em casos extremos, contribuir para a oncogênese quando houver uma predisposição para essa ocorrência. Lesões oxidativas específicas no DNA possuem ligação conhecida com determinadas alterações celulares malignas de mamíferos (NAKABEPPU *et al.*, 2006). Portanto, o uso de uma NP que leve a menor possibilidade de dano genético ao neonato é de suma importância. Desse modo, neste trabalho podem ser indicadas ações que minimizem os efeitos genotóxicos relacionados à TNP que incluem:

- A adoção do procedimento de quarentenização da NP contendo vitaminas durante 24 horas sob refrigeração, levando a uma menor taxa de dano genético, de acordo com os resultados do Induteste do ensaio com cepa MutY, sem prejuízo da

estabilidade físico-química da NPV. Apesar da alta variabilidade associada às necessidades nutricionais de um neonato prematuro esta sugestão torna-se benéfica quando o dano hepático é iminente;

- Uso de fotoproteção, desde o armazenamento até o término da infusão, minimizando a produção de peróxidos por fotoexposição das NP contendo vitaminas;
- Retirada dos elementos traço da formulação a ser quarentenizada, levando à administração em paralelo à infusão da NP, visto que no Induteste a refrigeração da NP contendo elementos traço não altera o fator de indução da NPO testada;
- Uso da formulação 3:1 de NP para neonatos prematuros no menor tempo de permanência possível, prevalecendo a intenção da via enteral de nutrição como via preferencial. O uso prolongado, muitas vezes desnecessário, pode levar a uma exposição inadequada do neonato a uma situação de risco com resultados a longo prazo ainda não esclarecidos.
- Adoção de procedimento de vigilância epidemiológica de longo prazo dos neonatos tratados com NP. Atenção maior deve ser dada a pacientes tratados com NP possuindo alterações genéticas que exponham seu DNA à condições genético-degenerativas.

A indicação da melhor condição para uso da NP deve ser vista com reticência por profissionais de saúde, pois envolve questões, muitas vezes não esclarecidas, no que tange à estabilidade da NP e à adequação da formulação às necessidades do neonato.

A adoção de novos métodos de análise físico-química, associados à rastreabilidade de alterações metabólicas relacionadas ao uso das formulações 3:1 de NP e, também, de possíveis

alterações no DNA de neonatos prematuros fazendo uso dessas misturas intravenosas pode levar a um esclarecimento maior dos riscos envolvidos com o uso e indicação de NP nesses pacientes.

8 **PERSPECTIVAS**

A comprovação do risco de mutagenicidade do uso de uma NP em sistemas procarióticos, associada a outros pré-existentes, tende a causar polêmica no meio hospitalar. Empresas e hospitais que fazem a manipulação de NP poderão ser questionados, além de causar insegurança entre os familiares de pacientes em tratamento. Os resultados podem levar à criação de um acompanhamento epidemiológico de pacientes tratados com NP, durante a fase neonatal, procedendo retroanálise em quaisquer eventos oncológicos.

Almeja-se, com a conclusão deste trabalho, uma evolução para uma etapa de estudos em organismos eucariotos seguida do uso de ensaios com células de mamíferos e avaliação *in vivo* dos possíveis danos genéticos gerados com o uso crônico de Nutrição Parenteral em neonatos prematuros.

9 REFERÊNCIAS

ALHAMA J., RUIZ-LAGUNA J., RODRIGUEZ-ARIZA A., TORIBIO F., LOPEZ-BAREA J. and PUEYO C., 1998. *Formation of 8-oxoguanine in cellular DNA of Escherichia coli strains defective in different antioxidant defences*. *Mutagenesis*; 13(6): 589-594.

ALLWOOD M.C. and MARTIN H.J., 2000. *The photodegradation of vitamins A and E in parenteral nutrition mixtures during infusion*. *Clinical Nutrition*; 19 (5): 339-342.

ALLWOOD M.C., 2002. *Reflections on current issues concerning the stability of parenteral nutrition mixtures*. *Nutrition*; 18: 691-692.

ANISIMOV V.N., 2002. *The relationship between aging and carcinogenesis: a critical appraisal*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*; 45: 277-304.

ANTÉBI H., MANSOOR O., FERRIER C., TÉTÉGAN M., MORVAN C., RANGARAJ J. and ALCINDOR L.G., 2004. *Liver function and plasma antioxidant status in intensive care unit patients requiring total parenteral nutrition: comparison of 2 fat emulsions*. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*; 28 (3): 142-148.

ANTHOLINE W.E., KALYANARAMAN B. and PETERING D.H., 1985. *ESR of copper and iron complexes with antitumor and cytotoxic properties*. *Environmental Health Perspectives*; 64: 19-35.

ARUOMA O.I., HALLIWELL B., GAJEWSKI E. e DIZDAROGLU M., 1991. *Copper-ion dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide*. *Biochemistry Journal*; 273: 601-604.

ASPEN, 2002. *Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients*. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 26 (1).

ASPEN, 2004. *Safe practices for parenteral nutrition*. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*; 28 (6).

BAL W. and KASPRZAK K.S., 2002. *Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals*. *Toxicology Letters*; 127: 55-62.

BASU R., MULLER D.P., EATON S., MERRYWEATHER I. and PIERRO A., 1999. *Lipid peroxidation can be reduced in infants on total parenteral nutrition by promoting fat utilisation*. *Journal of Pediatric Surgery*; 34 (2): 255-259.

BOHRER D., NASCIMENTO P.C., BINOTTO R., BECKER E. and POMBLUM S., 2002. *Contribution of the raw material to the Aluminium contamination in parenterals*. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*; 26: 382-388.

BOTTINO M., COWETT R.M. and SINCLAIR J.C., 2009. *Interventions for treatment of neonatal hyperglycemia in very low birth weight infants*. Cochrane Database of Systematic Reviews; Issue 1. Art. No.: CD007453. DOI: 10.1002/14651858.CD007453.pub2.

ANVISA-BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - republicada em 1999 - *Regulamento Técnico para a Terapia de Nutrição Parenteral*. Portaria 272/98, de 8 de abril de 1998.

CADET J., DOUKI T., GASPARUTTO D. and RAVANAT J.L., 2003. *Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features*. Mutation Research; 531: 5-23.

CAI W., WU J., HONG L., XU Y., TANG Q. and SHI C., 2006. *Oxidative injury and hepatocyte apoptosis in total parenteral nutrition-associated liver dysfunction*. Journal of Pediatric Surgery; 41: 1663-1668.

CHAUDHARI S. and KADAM S., 2006. *Total Parenteral Nutrition in neonates*. Indian Pediatrics 43: 953-964.

CHEN Q., ESPEY M.G., SUN A.Y., LEE J.H., KRISHNA M.C., SHACTER E., CHOYKE P.L., POOPUT C., KIRK K.L., BUETTNER G.R. and LEVINE M., 2007. *Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – PNAS; 104: 8749-8754.

CHESSEX P., LAVOIE J.C., LABORIE S. and ROULEAU T., 2001a. *Parenteral multivitamin supplementation induces both oxidant and antioxidant responses in the liver of newborn guinea pigs*. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition; 32: 316-321.

CHESSEX P., LABORIE S., LAVOIE J.C. and ROULEAU T., 2001b. *Photoprotection of solutions of parenteral nutrition decreases the infused load as well as the urinary excretion of peroxides in premature infants*. Seminars in perinatology; 25 (2): 55-59.

CUPPLES C.G. and MILLER J.H., 1989. *A set of LacZ mutations in Escherichia coli that allow rapid detection of each of the six base substitutions*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – PNAS; 86: 5345-5349.

CURY-BOAVENTURA M.F., GORJÃO R., LIMA T.M., NEWSHOLME P. and CURI R., 2006. *Toxicity of a soybean oil emulsion on human lymphocytes and neutrophils*. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition; 30: 115-123.

DANI C., CECCHI A. and BERTINI G., 2004. *Role of oxidative stress as physiopathologic factor in the preterm infant*. Minerva Pediatrica; 56 (4): 381-394.

DELGADO A.F., FALCÃO M.C. and CARRAZZA F.R., 2000. *Basis of nutritional support in pediatrics*. Jornal de Pediatria; 76 (3): S330-S338.

DESPOURT J.C., HOEDT B., PELAGATTI V., LAGARDE A., LORIEUL F., CHALMEL D., SULTAN F. and FEISS P., 1997. *Twenty-nine day study of stability for six different parenteral nutrition mixtures*. *Critical Care*; 1: 41-44.

DRISCOLL D.F., GIAMPIETRO K., WICHELHAUS D.P., PETERSS H., NEHNE J., NIEMANN W. and BISTRIAN B.R., 2001. *Physicochemical stability assessments of lipid emulsions of varying oil composition*. *Clinical Nutrition*; 20 (2): 151-157.

DRISCOLL D.F., NEHNE J., PETERSS H., KLUTSCH K., BISTRIAN B.R. and NIEMANN W., 2003. *Physicochemical stability of intravenous lipid emulsions as all-in-one admixtures intended for the very young*. *Clinical Nutrition*; 22(5): 489-495.

DRISCOLL D.F., 2005. *Stability and compatibility assessment techniques for total parenteral nutrition admixtures: Setting the bar according to pharmaceutical standards*. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*; 8: 297-303.

DRISCOLL D.F., 2006. *Lipid injectable emulsions: Pharmacopeial and safety issues*. *Pharmaceutical Research*; 23 (9): 1959-1969.

DRISCOLL D.F., LING P., ANDERSSON C. and BISTRIAN B.R., 2009. *Hepatic indicators of oxidative stress and tissue damage accompanied by systemic inflammation rats following a 24-hour infusion of an unstable lipid emulsion admixture*. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*; 33: 327-335.

DUPERTUIS Y.M., MORCH A., FATHI M., SIERRA C., GENTON L., KYLE U.G. and PICHARD C., 2002. *Physical characteristics of total parenteral nutrition bags significantly affect the stability of vitamins C and B₁: A controlled prospective study*. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*; 26: 310-316.

FALCÃO M.C., 2003. *Suporte nutricional no recém-nascido doente ou prematuro*. *Revista Médica*; 82 (1-4): 11-21.

FORTINI P., PASCUCCHI B., PARLANTI E., D'ERRICO M., SIMONELLI V. and DOGLIOTTI E., 2003. *8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways*. *Mutation Research*; 531; 127-139.

GAO D., WEI C., CHEN L., HUANG J., YANG S. and DIEHL A.M., 2004. *Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of fatty liver disease*. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*; 287: 1070-1077.

GIBBONS E., ALLWOOD M.C., NEAL T. and HARDY G., 2001. *Degradation of dehydroascorbic acid in parenteral nutrition mixtures*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 25: 605-611.

HELBOCK H.J. and AMES B.N., 1995. *Use of intravenous lipids in neonates*. *The Journal of Pediatrics*; 126:747-748.

- HONG L., WU J. and CAI W., 2007. *Glutathione decreased parenteral nutrition-induced hepatocyte injury in infant rabbits*. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition; 31: 199-204.
- JONAS C.R. and ZIEGLER T.R., 1998. *Nutrition support and antioxidant defenses: a cause for concern?* American Journal of Clinical Nutrition; 68: 765-767.
- JOSEPHY P.D., 2000. *The Escherichia coli lacZ reversion mutagenicity assay*. Mutation Research; 455: 71-80.
- KAWANISHI S., HIRAKU Y. and OIKAWA S., 2001. *Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging*. Mutation Research; 488: 65-76.
- KHASHU M., HARRISON A., LALARI V., GOW A., LAVOIE J.C. and CHESSEX P., 2006. *Photoprotection of parenteral nutrition enhances advancement of minimal enteral nutrition in preterm infants*. Seminars in Perinatology; 30: 139-145.
- KITCHEN P. and FORBES A., 1999. *Parenteral nutrition*. Current Opinion in Gastroenterology; 15 (2): 167.
- KITCHEN P. and FORBES A., 2000. *Intravenous nutrition: focus on delivery (3-in-1 bags or not?)*. Current Opinion in Gastroenterology; 16: 184-187.
- KNAFO L., CHESSEX P., ROULEAU T. and LAVOIE J.C., 2005. *Association between hydrogen peroxide-dependent byproducts of ascorbic acid and increased hepatic acetyl-CoA carboxylase activity*. Clinical Chemistry; 51 (8): 1462-1471.
- KRUIJMEEL J.W., NABER A.H., CURFS J.H., WENKER M.A. and JANSEN J.B., 2000. *With Medium-Chain Triglycerides, higher and faster oxygen radical production by stimulated polymorphonuclear leukocytes occurs*. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition; 24: 107-112.
- LABORIE S., LAVOIE J.C. and CHESSEX P., 2000. *Increased urinary peroxides in newborn infants receiving parenteral nutrition exposed to light*. The Journal of Pediatrics; 136 (5): 628-632.
- LABORIE S., LAVOIE J.C. and CHESSEX P., 1998. *Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: Implication in photoinduced peroxide generation*. Pediatric Research; 43(5): 601-606.
- LAVOIE J.C., CHESSEX P., GAUTHIER C., LEVY E., ALVAREZ F., ST-LOUIS P. and ROULEAU T., 2005. *Reduced bile flow associated with parenteral nutrition is independent of oxidant load and parenteral multivitamins*. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition; 41 (1):108-114.
- LAVOIE J.C. and CHESSEX P., 1997. *Bound iron admixture prevents the spontaneous generation of peroxides in total parenteral nutrition solutions*. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition; 25 (3): 307-311.

LEE M.D., YOON J.E., KIM S.I. and KIM I.C., 2003. *Stability of total nutrient admixtures in reference to ambient temperatures*. Nutrition; 19: 886-890.

LOBO B.W., 2005. *Avaliação da estabilidade físico-química de misturas totais de nutrientes para uso intravenoso neonatal*. Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

LOFT S. and POULSEN H.E., 1996. *Cancer risk and oxidative DNA damage in man*. Journal of Molecular Medicine; 74: 297-312.

MARCHINI J.S., OKANO N., CUPO P., PASSOS N.M., SAKAMOTO L.M. e BASILE-FILHO A., 1998. *Nutrição parenteral – princípios gerais, formulários de prescrição e monitorização*. Medicina; 31: 62-72.

MARIAN M., 1993. *Pediatric nutrition suport*. Nutrition in Clinical Practice; 8: 199-209.

MARON D.M. and AMES B.N., 1983. *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test*. Mutation Research; 113: 173-215.

MCCANN J. and AMES B.N., 1976. *Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – PNAS; 73 (3): 950-954.

MICHAELS M.L., CRUZ C., GROLLMAN A.P. and MILLER J.H., 1992. *Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – PNAS; 89: 7022-7025.

MOREAU P., BAILONI A. and DEVORET R., 1976. *Prophage λ induction in Escherichia coli K12 envA urvB: a highly sensitive test for potential carcinogens*. Microbiology; 73: 3700-3703.

MULLER R.H. and HEINEMANN S., 1994. *Fat emulsions for parenteral nutrition. III: Lipofundin MCT/LCT regimens for total parenteral nutrition (TPN) with low electrolyte load*. International Journal of Pharmaceutics; 101: 175-189.

NAKABEPPU Y., SAKUMI K., SAKAMOTO K., TSUCHIMOTO D., TSUZUKI T. and NAKATSU Y., 2006. *Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids*. Biological Chemistry; 387 (4): 373-379.

NEUZIL J., DARLOW B.A., INDER T.E., SLUIS K.B., WINTERBOURN C.C. and STOCKER R., 1995. *Oxidation of parenteral lipid emulsion by ambient and phototherapy lights: Potential toxicity of routine parenteral feeding*. The Journal of Pediatrics; 126: 785-790.

NISHIMURA M., YAMAUCHI A., YAMAGUCHI M., UEDA N. and NAITO S., 2005. *Soilbean oil in total parenteral nutrition maintains albumin and antioxidant enzyme mRNA levels*. Biological and Pharmaceutical Bulletin; 28 (7): 1265-1269.

NOHMI T., KIM S.R. and YAMADA M., 2005. *Modulation of oxidative mutagenesis and carcinogenesis by polymorphic forms of human DNA repair enzymes*. Mutation Research; 591: 60-73.

O'DONOVAN D.J and FERNANDES C.J., 2000. *Mitochondrial glutathione and oxidative stress: Implications for pulmonary oxygen toxicity in premature infants*. Molecular Genetics and Metabolism; 71: 352-358.

OLINSKI R., GACKOWSKI D., ROZALSKI R., FOKSINSKI M. and BIALKOWSKI K., 2003. *Oxidative DNA damage in cancer patients: a cause or a consequence of the disease development?* Mutation Research; 531: 177-190.

OLINSKI R., SIOMEK A., ROZALSKI R., GACKOWSKI D., FOKSINSKI M., GUZ J., DZIAMAN T., SZPILA A. and TUDEK B., 2007. *Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases*. Acta Biochimica Polonica; 54(1): 11-26.

PIRONI L., GUIDETTI M., ZOLEZZI C., FASANO M.C., PAGANELLI F., MERLI C., BERSANI G., PIZZOFRERATO A. and MIGLIOLI M., 2003. *Peroxidation potential of lipid emulsions after compounding in all-in-one solutions*. Nutrition; 19: 784-788.

QUILLARDET P. and HOFNUNG M., 1985. *The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures*. Mutation Research; 147: 65-78.

QUILLARDET P., HUISMAN O., D'ARI R. and HOFNUNG M., 1982. *SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli k-12 to measure genotoxicity*. Genetics; 79: 5971-5975.

RIBEIRO D.O., 2007. *Influência da relação Cálcio:Fósforo na estabilidade físico-química de misturas 3 em 1 para uso neonatal*. Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

ROSE J., GIBBONS K., CARLSON S.E. and KOO W.W., 1993. *Nutrient needs of the preterm infant*. Nutrition in clinical practice; 8: 226-232.

SANGRADOR C.O., VALDIVIESO M.F.B. and VALIÑO C.G., 1995. *Pediatric parenteral nutrition mixtures design program: validity and stability study*. Computers and Biomedical Research; 28: 271-281.

SASAKI Y., 2006. *Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma?* Journal of Gastroenterology; 41: 1135-1148.

SILVERS K.M., SLUIS K.B., DARLOW B.A., MCGILL F., STOCKER R. and WINTERBOURN C.C., 2001a. *Limiting light-induced lipid peroxidation and vitamin loss in infant parenteral nutrition by adding multivitamin preparations to Intralipid*. Acta Paediatrica; 90: 242-249.

SILVERS K.M., DARLOW B.A. and WINTERBOURN C.C., 2001b. *Lipid peroxide and hydrogen peroxide formation in parenteral nutrition solutions containing multivitamins*. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition; 25: 14-17.

SPENCER A.U., YU S., TRACY T.F., AOUTHMANY M.M., LLANOS A., BROWN M.B., BROWN M., SHULMAN R.J., HIRSCHL R.B., DERUSSO P.A., COX J., DAHLGREN J., STROUSE P.J., GRONER J.I. and TEITELBAUM D.H., 2005. *Parenteral nutrition-associated cholestasis in neonates: multivariate analysis of the potential protective effect of taurine*. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition; 29 (5): 337-343.

STEGER P.J.K. and MUHLEBACH S.F., 1998. *Lipid peroxidation of IV lipid emulsions in TPN bags: The influence of tocopherols*. Nutrition; 14 (2): 179-185.

TRAUL K.A., DRIEDGER A., INGLE D.L. and NAKHASI D., 2000. *Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides*. Food and Chemical Toxicology; 38 (1); 79-98.

TROSKO J.E., 1992. *Does radiation cause cancer?* Radiation Effects Research Foundation Update; 3-6.

TUDEK B., 2007. *Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers*. Molecular Aspects of Medicine; 28: 258-275.

USP 31 – (United States Pharmacopeia), 2008. *Pharmaceutical compounding – sterile preparations*. The United States Pharmacopeia, 31 rev., General test chapter 797; 2471-2477.

VALKO M., IZAKOVIC M., MAZUR M., RHODES C.J. and TELSER J., 2004. *Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence*. Molecular and Cellular Biochemistry; 266: 37-56.

VALKO M., RHODES C.J., MONCOL J., IZAKOVIC M. and MAZUR M., 2006. *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chemico-Biological Interactions; 160: 1-40.

VARGAS J.H., KLEIN G.L., AMENT M.E., OTT S.M., SHERRARD D.J., HORST R.L., BERQUIST W.E., ALFREY A.C., SLATOPOLSKY E. and COBURNJ.W., 1988. *Metabolic bone disease of total parenteral nutrition: Course after changing from casein to amino acids in parenteral solutions with reduced aluminium content*. American Journal of Clinical Nutrition; 48: 1070-1078.

VINNARS E. and WILMORE D., 2003. *History of parenteral nutrition*. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition; 27: 225-232.

WAITZBERG D.L. and CAMPOS A.C.L., 2003. *Nutrition support in Brazil: past, present, and future perspectives*. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition; 28 (3): 184-191.

WAITZBERG D.L., 2004. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. Ed. Atheneu, 8:151-165; 9: 167-177; 23: 375-381; 46: 735-751; 49: 777-787.

WALLACE S.S., 2002. *Biological consequences of free radical-damaged DNA bases*. Free Radical Biology and Medicine; 33 (1): 1-14.

YIN H. and PORTER N.A., 2003. *Specificity of the ferrous oxidation of xylenol orange assay: Analysis of autoxidation products of cholesteryl arachidonate*. Analytical Biochemistry; 313: 319-326.

ZELIKOVIC I., CHESNEY R.W., FRIEDMAN A.L. and AHLFORS CE., 1990. *Taurine depletion in very low birth weight infants receiving prolonged total parenteral nutrition: role of renal immaturity*. Journal of Pediatrics; 116 (2): 301-306.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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