UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

EFEITO DO SUCO DE UVA (VITIS LABRUSCA, BORDÔ) SOBRE INDICADORES FISIOPATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA SÍNDROME AGUDA DA RADIAÇÃO EM RATOS WISTAR

TESE DE DOUTORADO

Edson Ramos de Andrade

Santa Maria, RS, Brasil 2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

EFEITO DO SUCO DE UVA (VITIS LABRUSCA, BORDÔ) SOBRE INDICADORES FISIOPATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA SÍNDROME AGUDA DA RADIAÇÃO EM RATOS WISTAR

por

Edson Ramos de Andrade

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica**

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

Santa Maria, RS, Brasil 2010

Universidade Federal de Santa Maria Centro de Ciências Naturais e Exatas Pós-Graduação Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, Aprova a Tese de Doutorado

EFEITO DO SUCO DE UVA (VITIS LABRUSCA, BORDÔ) SOBRE INDICADORES FISIOPATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA SÍNDROME AGUDA DA RADIAÇÃO EM RATOS WISTAR

elaborada por **Edson Ramos de Andrade**

como requisito parcial para a obtenção de grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica**

COMISSÃO EXAMINADORA

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dra.
(Presidente/Orientador)

Monica Beatriz Mathor, Dra.
(IPEN/CNEN-SP)

Carlos Fernando de Mello, Dr.
(UFSM)

Rafael Noal Moresco, Dr.
(UFSM)

Sydney Hartz Alves, Dr.
(UFSM)

Santa Maria, 03 de março de 2010.

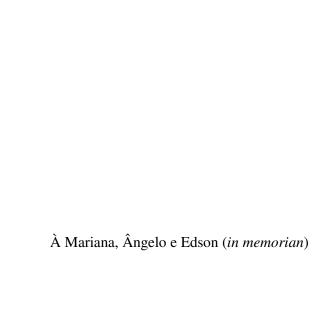
Quem duvidará das más consequências que advirão do fato:

De inteligências livres criadas por Deus serem obrigadas a se submeterem servilmente a uma vontade externa?

De sermos ensinados a renegar nossas intuições e submetê-las ao capricho de outros?

De pessoas sem competência serem arvoradas em juízes de competentes e terem autoridade assegurada para tratá-las a seu arbítrio?

Estas, sim, são inovações capazes de arruinar comunidades e subverter o Estado.



Agradecimentos

Agradeço a Deus e seus mensageiros, pela força e amparo nos momentos de incerteza, dor e dúvida.

Ao meu pai amado, que mesmo depois de partir, pela força e dignidade de seu nome contribuiu decisivamente para que este trabalho se iniciasse com apoio do Exército Brasileiro. Obrigado Meirelles!

À minha amiga e mãe, por estar junto comigo lutando em todos os combates. Obrigado Cristina!

À minha irmã Cristiane pelo incentivo constante, amor e carinho em todos os momentos.

Aos meus sogros e amigos Cleci e Adair pelo carinho de pais, tão necessário.

Ao Exmo Sr. Gen Div Dilson Corrêa de Sá e Benevides pelo incentivo, crédito e atenção, sendo marca indelével de todo o trabalho.

Ao professor Dr João Batista Teixeira da Rocha, pela luta incessante para que fosse criada esta oportunidade, convertendo-se em mais que um grande amigo e companheiro, um irmão.

Ao meu amigo, confidente e irmão, o Físico Nelson Mendes Alves pela paciência e bom humor diante de todas as minhas crises existenciais.

À Prof. Dra. Liliane de Freitas Bauermann pelo apoio para a criação e manutenção da linha de pesquisa em Radiobiologia na Universidade Federal de Santa Maria.

Ao Exmo Sr. Maj. Brig. Eng Paulo Roberto Carvalho Ferro, amigo e incansável motivador pela presença constante e sempre construtiva.

À minha amiga Monica Beatriz Mathor, pela confiança e incentivo no momento mais difícil de todo trabalho.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha (UFSM), Prof. Dr. Juan Pablo Barrio-Lera (Espanha) e Prof. Dra. Paquita Gonzáles (Espanha), pela segura orientação em todos os momentos quando do estágio na Espanha.

Em especial à minha orientadora, Profa. Dra. Ivana, que em todos os momentos esteve inabalavelmente ao meu lado mostrando-me o que é Ciência e a pedra fundamental do caminho: a vanguarda é solitária e incompreendida. Obrigado chefe!

À minha esposa Veronica, cujo amor, paciência e cooperação científica foram decisivos no trilhar dos caminhos desconhecidos que enfrentamos juntos no além-mar.

À secretaria da Pós-graduação do Programa nas pessoas de Angélica Balconi e Silvani Brondani pelo carinho, profissionalismo e atenção sempre dispensados a todos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, em especial a Prof^a. Dra Maria Rosa Chitolina Schetinger, sobretudo pela compreensão e paciência me ajudando a crescer sempre.

Ao professor Félix Alexandre Antunes Soares, do PPGBTOx pela grande cooperação e estima demonstrada ao longo dos trabalhos na Espanha quando fomos colegas naquele país.

A todos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pelo carinho e acolhida durante a implantação da linha de pesquisa em Radiobiologia nas dependências do Departamento.

A todo pessoal do Departamento de Morfologia da UFSM pela colaboração, especialmente ao Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira pela disponibilidade e boa vontade.

Aos amigos do Centro Tecnológico do Exército, especialmente na pessoa do Coronel Germano Klaus Wolff Filho e dos Tenentes-Coronéis Engenheiros Militares Carlos Eduardo da Mota Góes e Paulo Fernando Pinto Malizia Alves cujo apoio e incentivo foram decisivos na consecução deste trabalho.

Ao Comando do Colégio Militar de Santa Maria e amigos daquele colégio, pelo apoio constante nos procedimentos burocráticos que permearam minha ausência do Brasil.

À ECONATURA® pelo fornecimento do suco de uva utilizado neste trabalho estando sempre disponível ao atendimento a eventuais necessidades ao longo do seu desenvolvimento.

Aos animais cujas vidas proporcionaram resultados úteis ao avanço da Ciência, com profundo respeito agradeço somando a esperança de que um dia não mais seja necessário lançar mão deste recurso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante a estada no exterior.

Por fim, ao Exército Brasileiro, pelo crédito, apoio e, sobretudo pela liberdade, necessária ao cumprimento da difícil missão de quebrar paradigmas e lançar-se ao próximo passo, no longo caminho rumo ao futuro.

RESUMO

Tese de Doutorado Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITO DO SUCO DE UVA (VITIS LABRUSCA, BORDÔ) SOBRE INDICADORES FISIOPATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA SÍNDROME AGUDA DA RADIAÇÃO EM RATOS WISTAR

AUTOR: Edson Ramos de Andrade ORIENTADOR: Ivana Beatrice Mânica da Cruz CO-ORIENTADOR: Joao Batista Teixeira da Rocha LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, março de 2010

A exposição à radiação ionizante possui efeitos tóxicos indesejáveis e por este motivo investigações sobre alimentos ou fármacos com ação radiomodificadora positiva (protetora) é de grande interesse para a Saúde e Defesa Pública Nacional. Neste sentido, esta tese tem como perspectiva testar o suco de uva organicamente produzido (Vitis labrusca) como um radiomodificador positivo dos efeitos biológicos que caracterizam a Síndrome Aguda da Radiação (SAR). Para tanto foram utilizados 16 ratos Wistar machos divididos em quatro grupos, onde dois grupos foram irradiados de corpo inteiro de forma aguda com raios-X utilizando um irradiador de 200 kV especialmente concebido para amostras biológicas instalado na Universidad de León, Espanha. Os ratos receberam diariamente 10 ml de suco de uva ou placebo (solução isocalórica de glicose e frutose) para serem ingeridos ad libitum uma semana antes e duas depois da irradiação com 6 Gy de dose absorvida, quando foram eutanasiados. Foram avaliados e comparados parâmetros morfológicos, fisiológicos, biomoleculares e bioquímicos indicativos da SAR (anorexia, peso corporal e dos principais órgãos, parâmetros hematológicos, e indicadores do metabolismo oxidativo) no sistema gastrointestinal (fígado). Os resultados corroboram a hipótese de que a ingestão ad libitum crônica do suco de uva exerce efeito radiomodificador positivo contra a SAR.

Palavras-chave: Radiação ionizante, ratos, radiomodificadores, metabolismo oxidativo, Síndrome Aguda da Radiação

ABSTRACT

PhD Thesis Graduate Course in Toxicological Biochemistry Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF GRAPE JUICE (Vitis labrusca, bordô) OVER PATHOPHYSIOLOGIC AND BIOCHEMICAL INDICATORS IN ACUTE RADIATION SYNDROME IN WISTAR RATS

AUTHOR: Edson Ramos de Andrade ADVISOR: Ivana Beatrice Mânica da Cruz CO-ADVISOR: Joao Batista Teixeira da Rocha PLACE AND DATE OF THE DEFENSE: Santa Maria, 2010

Exposure to radiation has toxic effects and for this reason research on food or drugs with positive radiomodifying action (protective) is of outmost interest to Public Health and Consumer Protection. Thus, the aim of this study was testing the prospect grape juice (*Vitis labrusca*) as a positive radiomodifier of biological effects that characterize the Acute Radiation Syndrome (ARS). Sixteen male Wistar rats divided into four groups were used, where two groups are acutelly whole body X-irradiated and two were sham X-irradiated with a 200 kV X-rays machine specially designed for biological samples at the University of Leon, Spain. The rats received 10 ml of grape juice or placebo (isocaloric solution of glucose and fructose) to be consumed *ad libitum* one week before and two weeks after 6 Gy X-irradiation, when they were euthanasiated. Physiopathological, biomolecular and biochemical indications of ARS (anorexia, body weight and major organs, hematological parameters, and indicators of oxidative metabolism) were evaluated and compared with respect to the gastrointestinal system (liver). Results were in agreement with our hypotesis about a potential positive radiomodifier effect of grape juice intake against ARS.

Key-words: Radiation, rats, radiomodificadores, oxidative metabolism, Acute Radiation Syndrome

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 2 – Esquema de ação da glutationa
Figura 3 – Cascata de eventos da peroxidação lipídica
Figura 4 – Esquema da molécula de DNA e sua característica conformação em dupla hélice 25
Figura 5 – Tipos mais comuns de dano radioinduzido ao DNA
Figura 6 – Sub-síndromes associadas à SAR
Figura 7 – Quadro resumo dos principais eventos decorrentes da SAR
Figura 8 – Evolução temporal dos efeitos biológicos da radiação ionizante
Figura 9 – Exposição planejada e não-planejada à radiação ionizante
Figura 10 – Vinculação espaço temporal para o complexo de operações militares e civis em
ambiente radiológico ou nuclear
Figura 11 – Aplicação de radiomodificadores em Defesa
Figura 12 – Visão geral do trabalho de tese
TABELAS
Tabela 1 – Relação dose resposta para efeitos da SAR considerando exposição aguda de corpo inteiro em nível de dose letal para humanos (3 a 5,3 Gy). Adaptada de (NATO Handbook on the Medical Aspects of NBC Defensive Operations AMedP-6(B), Chapter 6, General Medical Effects of Nuclear Weapons: Diagnosis, Treatment, and Prognosis, 1 February, 1996).
Tabela 2 – Diferenças básicas entre alimentos funcionais e nutracêuticos

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	11
1. INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Espécies reativas de oxigênio	14
2.2 Sistema de defesa antioxidante	16
2.2.1 Defesa antioxidante enzimática	17
2.2.2 Defesa antioxidante não enzimática	19
2.2.2.1 A Glutationa (GSH)	20
2.3 Produção de radicais livres induzida por exposição à radiação	21
2.4 Efeitos da radiação ionizante na célula	22
2.5 Efeitos clínicos e biológicos	26
2.6 Síndrome aguda da radiação (SAR)	27
2.7 Antioxidantes como radiomodificadores	32
2.7.1 Radiomodificadores: o que são?	33
2.7.2 Aplicações dos radiomodificadores em Defesa	36
2.8 Antioxidantes naturais: o suco de uva orgânica como radiomodificador	40
3 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo geral	45
3.2 Objetivos específicos	45
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS	46
4.1 Artigo 1	47
4.2 Artigo 2	55
5 DISCUSSÃO	82
5.1 Alterações no peso corporal	84
5.2 Alterações hematológicas	86
5.3 Alterações hepato-oxidativas e hepato-metabólicas	89
5.4 Considerações metodológicas	92
6 CONCLUSÕES	94
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	95
Q DEFEDÊNCIA S	06

APRESENTAÇÃO

Este trabalho de tese possui uma característica intrínseca que é a multidisciplinaridade. Assim, torna-se obrigatória uma exploração abrangente, ao mesmo tempo em que relativamente aprofundada, de alguns tópicos mais afetos às aplicações tratadas diretamente na tese. Desta forma, o item Introdução apresenta uma revisão Bibliográfica que procura atender aos diversos aspectos teóricos associados ao trabalho de tese.

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos, os quais se encontram no item **Artigos Científicos**. As seções **Materiais e Metodos**, **Resultados**, **Discussão dos Resultados** e **Referências Bibliograficas**, encontram-se nos proprios artigos e representam a integra deste estudo.

Os itens, **Discussão** e **Conclusões** dispostas no final da tese, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos neste trabalho, limitações metodológicas e perspectivas de estudos futuros relacionados.

As **Referências Bibliográficas** listadas no final são as citadas somente nos itens **Introdução, Discussão** e **Conclusões** da tese, uma vez que cada um dos artigos elenca sua lista particular de referências bibliográficas.

1 INTRODUÇÃO

Conceitualmente, radiação ionizante é a radiação eletromagnética ou partícula de alta energia que, ao interagir com o meio absorvedor, tem a propriedade de transferir, integral ou parcialmente, energia para os átomos e moléculas deste meio, resultando no fenômeno conhecido como ionização (Kaplan, 1978).

A unidade de medida de dose de radiação é o gray (1 joule/quilograma). É uma unidade do Sistema Internacional de Unidades (SIU) que quantifica a dose de radiação absorvida. Esta unidade é moderna e substitui a unidade antiga *radiation absorbed dose* (rad), embora na prática médica ainda se encontre referências que utilizam esta unidade antiga. A relação entre as unidades gray e rad é simples e dada de tal forma que 1 gray = 100 rad.

Diferentes tipos de radiação podem gerar efeitos biológicos diversos. Para ajustar essa diferença, foi criado o conceito fator de qualidade (Q) (CNEN, 2005). A grandeza que considera o fator de qualidade da radiação também foi modernizada. A unidade antiga, radiation equivalente man (rem) para dose absorvida equivalente deve ser substituída pelo sievert (Sv), quando se trata de medidas considerando exposição a diferentes tipos de radiação (Tauhata, 2003). O fator de qualidade (Q) para a radiação gama e raios-X é igual a 1 (por definição). Por exemplo, para radiação alfa o valor de Q é 20, indicando que comparada às radiações X e gama as partículas alfa podem gerar 20 vezes mais dano que as radiações X e gama para o mesmo tecido biológico.

Dentre as consequências da interação da radiação ionizante com sistemas biológicos estão danos diretos e indiretos, que dependem de fatores como energia e tipo da radiação incidente (Tauhata, 2003). Raios gama e X, por exemplo, são radiações que interagem de modo indireto com as células, provocando a quebra de moléculas de água o que leva a uma contaminação no ambiente intracelular pela produção de metabólitos reativos capazes de causar dano (Tauhata, 2003). Partículas pesadas como as partículas alfa e nêutrons, por exemplo, interagem diretamente. Um exemplo de alvo preferencial para o modo direto de interação inclui efeitos da radiação nas bases nitrogenadas que compõem a estrutura do DNA. Esta interação provoca danos que têm como resultado mutações ou até mesmo o desencadeamento de processos cito-degenerativos que levam à morte celular.

Os pressupostos clássicos preconizados em 1906 por Bergonié e Tribondeau (Haber and Rothstein, 1969), sobre a influência da radiação em sistemas biológicos, pontuam que as

células imaturas, indiferenciadas e que apresentam divisão mitótica ativa são mais radiosensíveis. Por outro lado, células maduras, diferenciadas e que não apresentam divisão mitótica ativa (ou menos ativas) são mais radioresistentes. Portanto, células mitoticamente ativas são mais propensas a efeitos deletérios quando expostas às radiações ionizantes. Desta forma, células da medula óssea, mucosas e camadas germinativas da pele são muito mais radiosensíveis do que células como os neurônios, que não se replicam ou se replicam muito lentamente (Haber, 1969).

Como foi anteriormente comentado, uma vez que a radiação ionizante tem a capacidade de alterar a molécula de DNA, uma das suas possíveis consequências seria a indução de mutações nas células germinativas que produziriam a prole dos individuos afetados. Entretanto, existe grande dificuldade de encontrar evidências de que uma dada alteração orgânica é consequência exclusiva da exposição à radiação ionizante (Bolus, 2001).

Outra questão importante é que os efeitos da radiação ionizante dependem, dentre outros fatores, da dose total e da taxa de dose a que o organismo foi exposto (Muller, 1927).

Adicionalmente, é importante comentar que nem todos os efeitos associados a uma exposição à radiação ionizante são imediatamente observáveis. Geralmente ocorre um período latente, antes da detecção de qualquer resposta. Este período de latência poderá se prolongar por décadas, quando ocorre exposição a baixas doses de radiação, ou por um período de tempo muito curto, de alguns minutos ou horas, se ocorrer exposição em altas doses e/ou altas taxas de dose (Hall, 2006).

Após a consideração destes pressupostos é importante a revisão dos principais efeitos metabólicos desencadeados pela radiação ionizante nos sistemas biológicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Uma das principais conseqüências da ação da radiação ionizante sobre células e organismos como um todo diz respeito ao aumento dos desbalanços oxidativos e danos relacionados. Neste contexto, a seguir são comentados importantes aspectos da geração de espécies ativas de oxigênio, estresse oxidativo e sistemas de defesa antioxidante orgânica.

2.1 Espécies reativas de oxigênio

Aproximadamente 85 a 90% do oxigênio (O₂) consumido pelos animais é metabolizado nas mitocôndrias, fonte principal de produção de moléculas de alta energia (adenosina trifosfato, ATP) (Junqueira, 2005). A produção de energia consiste na oxidação de nutrientes (glicose) que desencadeia a transferência de seus elétrons, os quais são recebidos por transportadores tais como nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), flavina adenina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD).

A produção de espécies reativas de oxigênio no ambiente mitocondrial de mamíferos é importante porque fundamenta o dano oxidativo em muitas patologias e contribui para reduzir a sinalização redox da organela para o citosol e o núcleo. O fluxo de O2^{*-} está relacionado com a concentração de potenciais doadores de elétrons, os locais de concentração de O2 e na constante de segunda ordem para a taxa de reações entre eles. Dois modos de operação por mitocôndrias isoladas resultam em significativa produção de O2^{*-}: (i) quando a mitocôndria não estão produzindo ATP e, conseqüentemente, tem uma alta Δp (força protomotriz) e reduzida oferta de CoQ (coenzima Q) e (ii) quando há uma alta relação NADH / NAD⁺ matriz mitocondrial. Para mitocôndrias que estão ativamente produzindo ATP e, conseqüentemente, têm menor Δp e relação NADH / NAD⁺, a geração de O2^{*-} é muito menor. A geração de O2^{*-} dentro da matriz mitocondrial depende criticamente de Δp, da razão NADH / NAD⁺ e da razão CoQH2/CoQ e da concentração local de O2, que são altamente variáveis e de difícil medida *in vivo*, sendo relacionado, entretanto a possíveis implicações patológicas e à sinalização redox (MURPHY, P., 2009).

a) Superóxidos

São gerados continuamente por diversos processos celulares por meio de reações envolvendo O₂. Possui meia-vida relativamente curta, desaparecendo rapidamente em solução aquosa pela reação de dismutação apresentada na equação 1:

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H \to H_2O_2 + O_2$$
 (1)

A dismutação pode ocorrer por reação enzimática ou não. Em solução aquosa os superóxidos são fortes agentes redutores. Por este motivo, sua habilidade em reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} pode acelerar a reação de Fenton:

$$H_2O_2 + Cu^+/Fe^{2+} \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + Cu^{2+}/Fe^{3+}$$
 (2)

Os íons metálicos participantes da reação de Fenton são reciclados via ${\rm O_2}^{\bullet}$

$$Cu^{2+}/Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \to Cu^+/Fe^{2+} + O_2$$
 (3)

b) Peróxido de hidrogênio

É uma molécula intermediária formada pela reação de dismutação de O_2^- catalisada pela enzima SOD, pela redução de dois elétrons na molécula de O_2 e pela ação de diversas enzimas oxidases, localizadas nos peroxissomas. É altamente difusível tanto no ambiente intra como no extracelular. Reage lentamente com tióis, sais de ferro, proteínas heme e peroxidases para iniciar reações que geram radicais livres e peroxidações lipídicas. Em presença de metal de transição gera •OH via reação de Fenton (Vaconcelos, 2007).

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) não é um radical livre. Entretanto, tem importância principalmente pela sua capacidade de atravessar membranas biológicas e dar origem a outras espécies reativas com alto potencial de lesão no sítio do DNA (potencial genotóxico) como, por exemplo, o radical hidroxila (•OH). O peróxido de hidrogênio é, ainda, uma molécula sinalizadora intracelular catalizado por pelo menos duas enzimas antioxidantes como a catalase e glutationa peroxidase transformando-o em água (Vaconcelos, 2007).

c) Radical hidroxila

Considerado o mais reativo dos radicais livres de oxigênio, o •OH é formado a partir de H_2O_2 em reação catalizada por íons metálicos Fe^{2+} e Cu^+ pela reação de Fenton.

2.2 Sistema de defesa antioxidante

Uma vez que existe geração contínua de radicais livres pelo metabolismo celular, os organismos vivos aeróbios desenvolveram evolutivamente, mecanismos que permitem controlar a quantidade destas moléculas e a sua ação. Os mecanismos de defesa incluem a prevenção da formação dos radicais livres (antioxidantes preventivos) e das substâncias capazes de neutralizar radicais. Estes processos podem ser catalisados por enzimas ou não. Por este motivo há uma divisão didática em sistema antioxidante enzimático e sistema antioxidante não enzimático. Este último é obtido, em grande parte, via consumo de alimentos que possuem compostos bioativos com propriedades antioxidativas. A função destes sistemas antioxidantes é manter os níveis intracelulares de radicais livres em concentrações baixas ou dentro do esperado para que uma dada célula realize com eficiência as suas funções.

Além disso, muitas moléculas podem ser funcionalmente utilizadas no metabolismo corporal incluindo papel relevante no sistema imunológico do organismo (Emerit and Michelson, 1982).

Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio na produção de radicais livres em relação aos sistemas antioxidantes ocorre um processo conhecido como estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode induzir uma resposta antioxidante da célula, ou dano (Machlin e Bendich, 1987). Esta resposta adaptativa caracteriza-se pelo aumento das defesas antioxidantes. Porém, quando os níveis de produção não compensada de radicais livres se elevam, ocorrem danos celulares e teciduais importantes.

No caso, o dano celular pode ser definida como resultado de um estímulo físico ou químico, que transitória ou permanentemente altera a homeostase da célula (Halliwell, 1994). Em geral, as defesas antioxidantes consistem em (Halliwell, 1994): (a) agentes que removem radicais livres e outras espécies reativas, pelo metabolismo destas moléculas; (b) proteínas que diminuem a eficácia de moléculas pró-oxidantes como os íons de ferro e cobre; (c) proteínas que protegem biomoléculas contra danos, inclusive aqueles oxidativos; causados por outros mecanismos. Estas incluem as chamadas proteínas de choque térmico, e (d) agentes de

baixo peso molecular com atividade de sequestrar (*scavenger*), ou seja, de limpeza de metabólitos indesejáveis.

2.2.1 Defesa antioxidante enzimática

Entre os agentes que metabolizam os radicais livres, o sistema enzimático antioxidante é de grande relevância, envolvendo a catálise do radical superóxido que é a principal espécie ativa de oxigênio produzida na mitocôndria durante a respiração celular. A cadeia enzimática envolvida nesta reação antioxidante é caracterizada a seguir (figura 1):

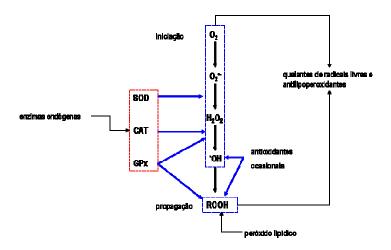


Figura 1 - Sistema antioxidante primário

a) Superóxido dismutase (SOD)

A SOD é uma enzima que tem como principal função catalisar o radical superóxido (O2°) em peróxido de hidrogênio (H2O2). A SOD metaboliza o O2° a H2O2 via três isoenzimas produzidas por três genes nucleares diferentes que utilizam metais como co-fatores. A isoenzima SOD dependente de manganês (MnSOD ou SOD2) atua na catálise do O2° em H2O2 dentro da mitocôndria. As outras duas isoenzimas são dependentes de cobre ou zinco (Cu/ZnSOD ou SOD1 e SOD3) e atuam, respectivamente, no citosol e matriz extracelular (Lehnert, 2008). A reação química antioxidante ocorre a partir de duas moléculas de

superóxido que interagem para formar peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular conforme a reação apresentada por

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \to H_2O_2 + O_2 \tag{4}$$

Concentrações relativamente altas de O_2 são encontradas na mitocôndria possivelmente devido à elétrons da cadeia transportadora. Entretanto, em geral, a MnSOD apresenta alta eficiência na sua metabolização sendo considerada, portanto, uma molécula essencial para a vida da célula e do organismo como um todo. Existem estudos utilizando agonistas miméticos sintéticos da SOD mostrando proteção destes compostos na sobrevivência de camundongos submetidos a doses letais de radiação X e γ (Vajragupta et al., 2003; Epperly et al., 2008; Jiang et al., 2008; Zhang et al., 2008).

b) Catalase (CAT)

A CAT é uma enzima que catalisa a dismutação do H_2O_2 para formar O_2 e H_2O , sendo muito difícil a enzima ser saturada pelo seu substrato (H_2O_2). A CAT se encontra nos peroxissomas, de onde remove o H_2O_2 gerado principalmente pela β -oxidação dos ácidos graxos. Também está presente nos eritrócitos e em menor quantidade no plasma sanguíneo e sua atividade catalítica é o principal processo regulador dos níveis intracelulares de H_2O_2 . A catalase das células animais é formada por quatro subunidades, onde cada uma possui um grupo heme em seu sítio ativo. A dismutação do peróxido de hidrogênio por ação da catalase segue a reação (Gaetani et al., 1989):

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2 \tag{5}$$

c) Glutationa peroxidase (GPx)

Em mamíferos existe pelo menos quatro variações da enzima GPx (GPx₁₋₄), todas contendo seleno cisteína. As enzimas GPx₁ e GPx₄ são citosólicas e também conhecidas como fosfolipídio hidroperóxido GPx, sendo abundantes na maioria dos tecidos. Todas as GPx catalisam a redução de H₂O₂ valendo-se de GSH como substrato. A GPx pode ainda reduzir peróxidos lipídicos nas membranas celulares produzidos por álcool, como sugere a reação:

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GPx} ROH + GSSG + H_2O$$
 (6)

A equação 6 mostra duas moléculas de GSH oxidadas a GSSG que é reduzida pela enzima glutationa redutase (GRd). A Figura 2 apresenta esquematicamente a ação da glutationa, onde o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é eliminado pela oxidação de duas moléculas de GSH formando glutationa dissulfeto (GSSG). Esta subsequentemente pode ser reduzida pela enzima glutationa redutase (GRd) envolvendo consumo de NADPH (nicotinamida-adenina dinucleotídio-fosfato). A Figura 2 apresenta esquema do sistema antioxidante primário.

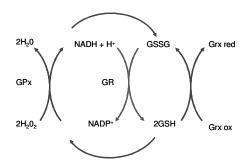


Figura 2 – Esquema de ação da glutationa

2.2.2 Defesa antioxidante não enzimática

Como foi anteriormente comentado existem compostos antioxidantes não enzimáticos que em sua maioria não são produzidos pelo organismo, sendo obtidos através da alimentação. A seguir são comentadas as características de algumas das principais moléculas antioxidantes não-enzimáticas.

2.2.2.1 A Glutationa (GSH)

A glutationa (GSH) é um tripeptídeo de baixo peso molecular contendo tiol (-SH) e é substrato para a enzima GPx, conforme reação:

$$HOOH + 2GSH \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O \tag{7}$$

A glutationa oxidada (GSSG) é reduzida a GSH pela enzima glutationa redutase (GRd) que utiliza NADPH para catalisar a reação:

$$GSSG + NADPH + H^{+} \xrightarrow{GRd} 2GSH + NADP^{+}$$
(8)

A GSH tem várias funções, podendo-se citar seu papel no metabolismo atuando como cofactor para a família de enzimas do tipo peroxidase. Está envolvida no metabolismo do ácido ascórbico, na comunicação intercelular, prevenindo a oxidação e a ocorrência de ligações cruzadas dos grupos –SH de proteínas, da cisteína e coenzima A (CoA) (Halliwell e Gutteridge, 1999). Também parecem atuar no transporte intracelular do cobre, diminuindo a disponibilidade de íons Cu (II) e consequente geração de radicais livres. É um agente radioprotetor e intervém nas vias enzimáticas (GSH-S-transferases) e não enzimáticas de detoxificação de compostos xenobióticos (Gibson et al., 1985).

Os níveis de GSH variam de acordo com diversas condições fisiológicas, incluindo o envelhecimento e neoplasias, geralmente, relacionadas com aumento da peroxidação lipídica. A diminuição da GSH pode estar relacionada com o aumento da velocidade de oxidação ou uma diminuição da sua síntese e reciclagem. A síntese do GSH é limitada pela disponibilidade de seu substrato, a cisteína. Quando a concentração dos peróxidos aumenta, a atividade das enzimas GPx e GT (glutationa transferase) aumenta também. Tal aumento resulta em uma maior necessidade de GSH como substrato tendo como conseqüência uma diminuição no conteúdo da GSH total disponível.

2.3 Produção de radicais livres induzida por exposição à radiação

Estudos sistemáticos sobre efeitos da radiação ionizante na água líquida tiveram início na década de 1940, na Universidade de Chicago como parte do trabalho de construção da primeira bomba atômica (Halliwell, 1994). No caso, o reator nuclear dedicado à produção de plutônio produzia nêutrons que deveriam ser moderados. Ou seja, a energia destes nêutrons teria que ser diminuída para favorecer interações e causar fissão nuclear. Para causar a moderação dos nêutrons os pesquisadores utilizaram um fluxo muito rápido de água. Utilizando este processo descobriu-se que a radiação agia sobre as moléculas da água provocando ionizações. Verificaram então, que tal processo poderia ser danoso para sistemas biológicos uma vez que a água é o principal componente dos seres vivos.

Hoje é sabido que, qualitativamente, não importa se a radiação é particulada ou composta por fótons, o resultado de uma única interação da radiação com a água tem como conseqüência o desencadeamento de uma cascata de eventos que geram moléculas ionizadas ou excitadas de água que acabam por se decompor em hidrogênio e radicais livres. Esta hipótese foi sugerida por Risse em 1929 e mais tarde por Weiss em 1944 (Anderson, 1996; Pompella, 1997). A ideia básica foi descrita em termos da reação:

$$H_2O \xrightarrow{radiação} H^{\bullet} + {}^{\bullet}OH \tag{9}$$

Como o balanço das reações de redução e oxidação (redox) em sistemas biológicos é determinado pela presença de pares redox responsáveis pelo fluxo de elétrons, estes sofrem freqüentes interconversões entre o estado reduzido e o oxidado. Alguns desses pares são interligados e outros constituem sistemas independentes (Vaconcelos, 2007). Assim, alterações no balanço redox de sistemas biológicos podem resultar em estresse oxidativo (Schafer e Buettner, 2001). A intensidade e patogenicidade destas alterações vão depender, dentre outros fatores, das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes (Gow e Ischiropoulos, 2001). Por este motivo, um dos efeitos tóxicos mais importantes decorrentes da exposição à radiação ionizante é a degradação da molécula de água (radiólise) e a subseqüente geração de radicais livres.

Além da produção de radicais livres via radiólise, outros processos metabólicos respondem à exposição à radiação e incrementam a produção de espécies reativas. Há

registros de efeitos decorrentes da geração de radicais livres de oxigênio minutos após a exposição de células à radiação ionizante (Leach et al., 2001; Lehnert, 2008).

Existem indicações de que a mitocôndria seja o principal local de produção de radicais livres quando ocorre exposição à radiação ionizante. O aumento da produção de espécies reativas é geralmente acompanhado pela diminuição dos níveis de GSH, indicativo de funcionamento do sistema antioxidante natural do organismo no combate aos subprodutos do estresse oxidativo induzido por radiação (Morales et al., 1998). Estudos mais recentes corroboram a ideia de que as mitocôndrias estariam envolvidas nos processos pró-oxidantes após algumas horas da exposição à radiação ionizante (Leach et al., 2002; Mikkelsen and Wardman, 2003).

Pode-se ainda apontar como uma importante alteração metabólica radioinduzida o aumento da atividade do ciclo das pentoses (Varnes, 1988; Tuttle et al., 1992), que é responsável pela produção dos equivalentes redutores na forma de NADPH e ribose-5-fosfato para síntese de RNA e DNA. Sob condições de grande estresse oxidativo, a produção de NADPH faz com que não ocorra a etapa de produção de ribulose-5-fosfato que é precursora da ribose-5-fosfato. Assim, o aumento de estresse oxidativo induzido por radiação atua no metabolismo da glicose através do ciclo das pentoses pela participação do NADPH (Tuttle et al., 2000). Existem, ainda, evidências de estresse oxidativo proveniente da interação da radiação com a cadeia transportadora de elétrons e as enzimas oxiredutases (Mikkelsen and Wardman, 2003).

2.4 Efeitos da radiação ionizante sobre a célula

As membranas celulares são basicamente formadas por uma dupla camada lipídica com moléculas de proteínas imersas ou ligadas a sua superfície. As membranas celulares são importantes alvos do estresse oxidativo radioinduzido. Lipídios poliinsaturados (*PUFAs – Polyunsatureted Fatty Acids*) da membrana plasmática possuem ligações duplas em carbonos adjacentes, que tem forte propensão a reagirem com espécies ativas como o •OH, H⁺ ou O₂•¬, formando peróxidos lipídicos (Stark, 1991; Albanese and Dainiak, 2003) As reações com lipídios de membrana na presença de oxigênio levam à peroxidação lipídica mesmo em baixas taxas de dose de radiação (Lehnert, 2008).

Inicialmente a peroxidação lipídica é causada pela reação dos lipídios da membrana com qualquer espécie reativa o suficiente para sequestrar o átomo de hidrogênio do grupo metileno $(-CH_2-)$. Este processo é esquematizado na equação 10 tomando como exemplo a reação entre lipídios da membrana plasmática e o radical hidroxil.

$$-CH_{2} \longrightarrow CH \longrightarrow CH - +H_{2}O$$

$$(10)$$

Sequestro de H por 'OH formando H₂O e - 'CH-

A Figura 3 mostra as etapas de produção dos peróxidos lipídicos que ocorrem na presença do radical 'OH. Este radical subtrai um átomo de hidrogênio de uma molécula de lipídio insaturado gerando um radical lipídico. Na presença de oxigênio, o radical lipoperóxido é formado e subtrai átomos de hidrogênio de moléculas lipídicas vizinhas formando a molécula de hidroperóxido lipídico. A produção desta molécula regenera o radical lipídico iniciando um ciclo de peroxidação. Assim, pode-se dizar que o 'OH desencadeia um ciclo que perpetua o processo de degeneração oxidativa das moléculas lipídicas poliinsaturadas da membrana plasmática.

Alterações estruturais da membrana plasmática levam ao colapso funcional da membrana. A transição de fase provocada pela lipoperoxidação é na verdade, devida à formação de produtos polares que aumentam a constante dielétrica no núcleo hidrofóbico da dupla camada lipídica (Stark, 1991). Este aumento de polaridade aumenta a rigidez da membrana plasmática, pelo aumento da sua microviscosidade, restringindo a sua mobilidade (Chatterjee and Agarwal, 1988; Stark, 1991).

Este fenômeno altera a fluidez e outras importantes funções da membrana plasmática (Ianzini, Guidoni et al. 1984). Dentre as inúmeras técnicas eficientes na detectação da peroxidação lipídica pode-se citar a que utiliza a reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (*TBARS* - *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). É uma técnica que apresenta muita sensibilidade em detrimento da especificidade oferecida (Ohkawa et al., 1979).

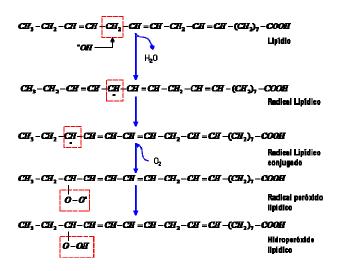


Figura 3 – Cascata de eventos da peroxidação lipídica

Uma consequência da lipoperoxidação é o aumento da permeabilidade da membrana a íons e moléculas pequenas, aumentando a propensão à intoxicação (Stanimirovic et al., 1995). Por outro lado, o aumento da ocorrência de microviscosidades resulta na formação de poros na membrana plasmática que a tornam menos seletiva. Em linfócitos, estes poros são detectáveis por microscopia eletrônica após 15 minutos da exposição à radiação X a uma dose de 10 Gy (Chandra and Stefani, 1981).

Muito do que se estuda sobre a interação da radiação ionizante com células de mamíferos está centrado no paradigma do possível dano radioinduzido ao núcleo celular e seus componentes. Pouca atenção e na verdade crescente nos últimos anos é dada ao que se passa no ambiente citoplasmático, cuja perturbação em seu estado redox pode permanecer por períodos que variam de segundos a dias (Lehnert, 2008). Embora muito se conheça a respeito das alterações moleculares associadas ao estresse oxidativo radioinduzido, as contribuições para respostas biológicas no nível orgânico ainda não são bem entendidas.

Dano radioinduzido ao DNA: Todas as formas de vida conhecidas no planeta armazenam suas informações de caráter hereditário na molécula de DNA (DeoxyriboNucleic Acid). A molécula de DNA consiste de duas cadeias longas de polinucleotídeos unidas por pontes de hidrogênio e compostas por quatro tipos de subunidades, adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T). Os nucleotídeos são covalentemente ligados através de açúcares e

fosfatos, formando um esqueleto. A Figura 4 mostra esquema da molécula de DNA e sua característica conformação em dupla hélice.

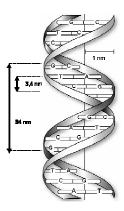


Figura 4 – Esquema da molécula de DNA e sua característica conformação em dupla hélice

O dano no DNA ocorre pelo depósito de energia pela radiação ionizante, de forma quase proporcional à massa molecular de cada molécula, geralmente levando a quebras simples da dupla hélice (*Single Strand-Breaks* – SSB), quebras duplas da dupla hélice (*Double Strand-Breaks* – DSB), danos nas bases nitrogenadas, nas fitas entre outros (Sapora et al., 1991; Lehnert, 2008).

A Figura 5 ilustra os principais tipos de danos radioinduzidos ao DNA. No início das pesquisas em Radiobiologia os estudos sobre o dano ao DNA foram conduzidos por duas abordagens distintas. A primeira utilizou métodos de extração do DNA que foram diretamente irradiados a fim de se determinar os efeitos diretos. A segunda abordagem avaliou o efeito da irradiação na molécula de DNA em seu meio natural, buscando efeitos indiretos no solvente (Sonntag, 1987). Ambas as abordagens forneceram informações importantes que subsidiaram estudos em Radiobiologia.

Atualmente sabe-se que as consequências radioquímicas da ação da radiação ionizante sobre o DNA e a água circunvizinha são interrelacionadas e sugerem um modelo que prevê dois compartimentos hidratados distintos: (a) um ligado fortemente à molécula de DNA, muito próximo, e (b) outro mais distante menos ligado. Com uma taxa de 337 danos/célula/Gy irreparáveis em um total de 1000 danos/célula/Gy no sítio ligado Swarts e colaboradores (1996) sugerem que no máximo cerca de 2/3 do dano provocado pelo radical

hidroxil na camada ligada é reparável por moléculas com atividade *scavenger* (Roots e Okada, 1972).

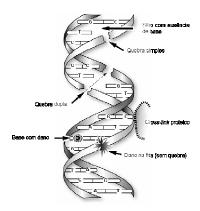


Figura 5 - Tipos mais comuns de dano radioinduzido ao DNA

Paralelamente aos estudos radioquímicos, surgiram trabalhos no campo dos modelos celulares. O primeiro trabalho deste tipo utilizou a bactéria *Escherichia coli* (*E.coli*) (Johansen, 1965) e mostrou que aproximadamente 65% da morte celular causada pela radiação estava relacionada à produção e ação do radical hidroxil. Os autores também observaram que não ocorreu aumento na proteção dos danos causados pela irradiação quando foram inseridos compostos com atividade *scavenger*.

2.5 Efeitos clínicos e biológicos

Células danificadas por interação com altas doses de radiação ionizante poderão sofrer danos tais que podem levar à morte celular, geralmente durante a fase de replicação das células (apoptose). Doses mais baixas, no entanto, podem provocar danos à moléculas de DNA que podem não ser deletérios, mas podem causar efeitos posteriores, incluindo a transformação neoplásica (Park, 1993).

Em termos fisiopatológicos a exposição à radiação ionizante oferece dois tipos de efeitos clínicos sobre o organismo: os efeitos determinísticos e os efeitos estocásticos. O

efeito determinístico aparece logo após a exposição, possuindo um limiar para o seu aparecimento e sua severidade proporcional à dose de radiação. O conjunto de alterações orgânicas conhecido como Síndrome Aguda da Radiação (SAR) é um exemplo de efeito determinístico (Browne et al., 1992; Waeckerle et al., 2001). Os efeitos estocásticos aparecem muito tempo após a exposição (anos). Neste caso, a severidade dos danos não está relacionada com a dose de radiação, embora a probabilidade de sua ocorrência esteja positivamente relacionada à dose (Browne et al., 1992). Desta forma, pode-se afirmar que o risco de carcinogênese radioinduzida está intrinsecamente relacionado com a dose e possivelmente com a taxa de dose (Browne et al., 1992).

2.6 Síndrome aguda da radiação (SAR)

A SAR é caracterizada por um conjunto de alterações biológicas que ocorrem após a exposição aguda, e de corpo inteiro, à radiação ionizante (Figura 6). Sem assistência médica adequada, a dose letal de radiação (DL) que leva a óbito 50% das pessoas expostas em um período de 60 dias (DL_{50/60}) é estimada no intervalo de 3,5 a 4,0 Gy. Estudos mostram que cuidados clínicos intensivos apropriados podem deslocar a (DL_{50/60}) para doses no intervalo de 5 a 6 Gy (Browne et al., 1992).

Os sintomas da SAR podem variar de acordo com a sensibilidade individual à radiação, o tipo e a dose de radiação absorvida. Uma primeira avaliação da dose absorvida é importante na determinação da estratégia clínica a ser adotada. Para uma avaliação dosimétrica com objetivos clínicos, pode-se observar o tempo decorrido entre a exposição e o início dos sintomas ou lançar mão da contagem de hemocomponentes como indicadores biodosimétricos. A medida da cinética de depleção dos linfócitos é um bioindicador conhecido e útil (Dons, 1989).

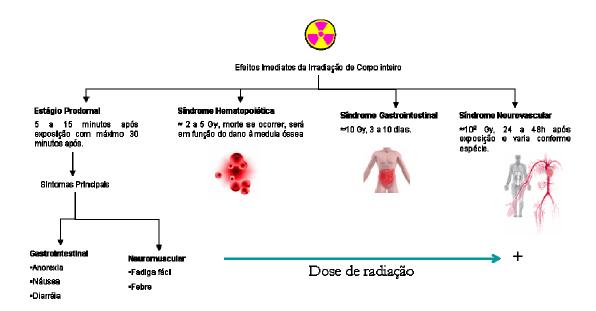
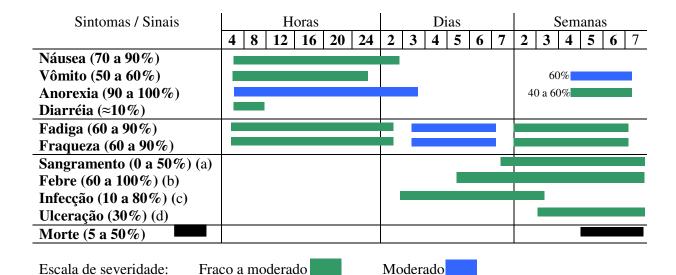


Figura 6 - Sub-síndromes associadas À SAR

O padrão ouro para a dosimetria é a avaliação da ocorrência de aberrações cromossômicas (análises citogenéticas), mas este método exige tempo e experiência do laboratório inviabilizando, muitas vezes, uma análise em tempo real (Dons, 1989). Os cuidados clínicos na presença da SAR incluem basicamente: (a) isolamento do indivíduo, (b) reposição de líquidos e eletrólitos, (c) uso de estimulantes de proliferação celular de células da medula óssea e (d) apoio psicológico (Koenig et al., 2005). A tabela 1 mostra a relação dose resposta para efeitos da SAR para exposição aguda de corpo inteiro em um nível de dose letal para humanos.

Tabela 1 – Relação dose resposta para efeitos da SAR considerando exposição aguda de corpo inteiro em nível de dose letal para humanos (3 a 5,3 Gy). Adaptada de (NATO Handbook on the Medical Aspects of NBC Defensive Operations AMedP-6(B), Chapter 6, General Medical Effects of Nuclear Weapons: Diagnosis, Treatment, and Prognosis, 1 February, 1996)



- (a) apresenta queda moderada na contagem de plaquetas
- (b) apresenta queda moderada na contagem de granulócitos
- (c) apresenta queda moderada a severa na contagem de linfócitos
- (d) depilação

Assim, de modo geral, a SAR pode ser o final de um processo induzido por um desequilíbrio do estado redox, associado a um funcionamento deficiente do sistema de defesa antioxidante, ou ainda por uma combinação dos mesmos (Leoš Navrátil, 2008). Existem poucos estudos publicados considerando as relações entre dose de radiação e o mecanismo de ação das radiações relacionados com alterações posteriores no organismo (Wang et al., 2003). Esta falta de informações parece ser um problema crônico na área da Radiobiologia uma vez que tal comentário já foi feito há 30 anos por Czapski (1980). De qualquer forma existem protocolos de ação relacionados com o manejo da SAR (Figura 7).

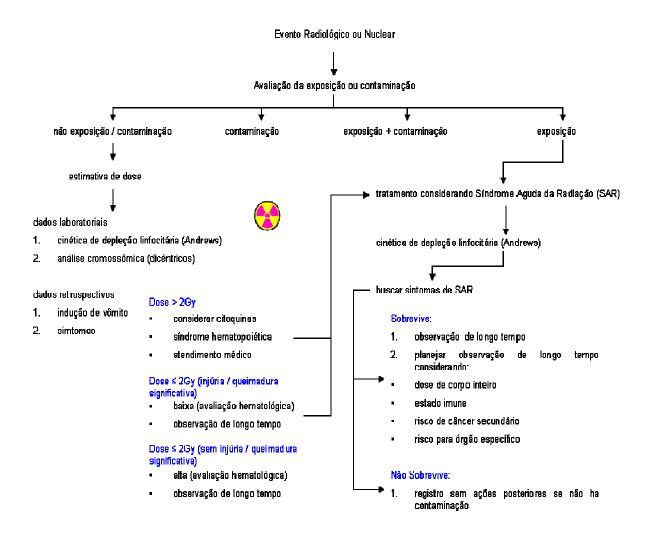


Figura 7 – Quadro resumo dos principais eventos decorrentes da SAR

SAR e o estresse oxidativo: em geral, pode-se dizer que na condição de SAR ocorre um aumento da peroxidação lipídica. A SAR está associada a um aumento na peroxidação lipídica avaliada através dos níveis de malondialdeído (MDA) no plasma sanguíneo de ratos, após exposição de corpo inteiro a uma dose de 5,5 Gy (Deger et al., 2003). Também foi relatado aumento da concentração de MDA no fígado de ratos após irradiação fracionada (Marchenko et al., 2002). A dependência da concentração de MDA em trombócitos de porcos após a sua exposição a doses de radiação gama de 10 a 100 Gy foi adicionalmente descrita por Wachowicz et al. (1984). Entretanto, também existem estudos descrevendo concentrações mais baixas de MDA logo após a exposição de ratos a uma dose de 18 Gy (Jin et al., 2005).

SAR e o sistema enzimático antioxidante primário: as informações disponíveis na literatura não são uniformes em relação à atividade de alguns componentes do sistema primário de defesa antioxidante após a exposição à radiação ionizante. Alguns trabalhos realizados em cobaias descrevem decréscimos na atividade da SOD para importantes órgãos como os rins quando ocorre exposição de corpo inteiro a uma dose de 15 Gy (Bukan et al., 2003). Outros relatam decréscimo da atividade da SOD no plasma sangüíneo de ratos após a exposição de doses fracionadas em 2 x 0,36 Gy (Russanov et al., 1979; Kaya et al., 1999) ou na exposição a doses menores que 0,20 Gy (Yamaoka et al., 1994). Em contrapartida, outros autores descrevem aumento na atividade da SOD no miocárdio de ratos após exposição de corpo inteiro a dose de 18 Gy (Jin et al., 2005), fato também observado no hipotálamo destes animais (Kandasamy et al., 1993). Há também resultados controversos com relação à atividade da enzima GPx frente à radioexposição. Bukan et al. (2003) relataram no seu estudo a ocorrência de diminuição da atividade desta enzima nos rins de cobaias expostas a uma dose de corpo inteiro, de 8 Gy.

Em contraste, foi observado um aumento aproximado de 25% da atividade da SOD (Cu/Zn) após doses de radiação X da ordem de 0,20 Gy (Yamaoka et al., 1994). Entretanto, este fato não foi observado na enzima MnSOD (SOD dependente de manganês) que age em nível mitocondrial. Por outro lado, no mesmo experimento, a atividade enzimática tanto da SOD (Cu/Zn) quanto da MnSOD no fígado fetal de ratos aumentaram significativamente de 15 a 35% (Yamaoka et al., 1994). Foi relatado ainda que a expressão do mRNA para os dois tipos de SOD aumentou de 20 a 30% quatro horas após a exposição à dose aguda de corpo inteiro de 1 Gy de radiação X, comparado ao grupo controle (Yamaoka et al., 1994). Por este motivo, os autores sugeriram que a exposição à radiação em doses baixas promove um aumento no nível de mRNA da SOD.

A concentração da GSH está relacionada com a atividade da enzima GPx e altos valores absolutos da GSH, em especial nos tecidos e plasma sanguíneo, são caracterizados pela sua considerável propagação pelo organismo (Leoš Navrátil, 2008). Por isso, a dinâmica das mudanças pós-irradiação devem ser investigadas considerando também os níveis de GSH (Bhattathiri et al., 1994). Efeitos pós-irradiação relatados por Deger et al. (2003) relatam a diminuição da concentração da GSH no sangue de coelhos. Kaya et al. (1999) e Kojima et al. (1998) também descreveram a diminuição dos níveis de GSH no plasma de ratos. Groen et al. (1996) não observaram mudanças na concentração da GSH nos eritrócitos de ratos. Outros autores, em experimentos realizados em coelhos com exposição de corpo inteiro com uma dose de radiação de 5,5 Gy observaram ocorrência da redução da atividade da enzima GPx no

sangue (Deger et al., 2003) e no hipotálamo (Kandasamy et al., 1993). Semelhantes resultados para a GPx foram encontrados no plasma sangüíneo de ratos (Kaya et al., 1999).

Com relação ao fracionamento da dose absorvida, que pode levar a efeitos diversos daqueles registrados para exposição aguda, Jadhav et al. (1998) estudaram a variação da concentração de GSH em tumores de colo de útero, concluindo que as alterações nos níveis de GSH no sangue poderiam indicar a radioresistência do tumor.

Adicionalmente, existem registros feitos por Kalinina et al. (1999), relatando variações nos níveis de GSH e da atividade da enzima GPx nas células do fígado, miocárdio e eritrócitos em modelos experimentais. Há registro ainda de estudo com humanos relatando alterações na atividade da SOD e GSH em vítimas do acidente nuclear de Chernobyl (Vartanian et al., 2004).

Do exposto se pode concluir que existem indicações de uma resposta diferenciada do sistema enzimático antioxidante na SAR dependente do tipo de célula, tipo de órgão, dose de radiação e da espécie animal. Esta variação é claro que dificulta os estudos relacionados aos efeitos da radiação ionizante em sistemas biológicos. Entretanto, apesar da variação observada são de grande relevância investigações que analisem o efeito de moléculas radiomodificadoras com ação antioxidante que podem ser utilizadas como agentes protetores dos seus efeitos negativos.

2.7 Antioxidantes como radiomodificadores

Em geral, a ocorrência de estresse oxidativo moderado no organismo é acompanhada por um aumento da atividade das defesas antioxidantes enzimáticas endógenas. Entretanto, quando ocorre uma produção de radicais livres em alta escala o sistema enzimático antioxidante não consegue vencer a demanda. Este processo, conhecido como estresse oxidativo, implica em aumento na taxa de dano às moléculas e estruturas celulares (Anderson, 1996). O estresse oxidativo tem sido relacionado com a etiologia de várias doenças como cardiopatias e problemas pulmonares tendo os danos ao DNA um papel importante na carcinogênese (Lehnert, 2008).

Deste modo, o consumo de antioxidantes exógenos é benéfico porque estes compostos atuam em diferentes níveis na proteção do organismo: (a) o primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações

em cadeia envolvendo ferro e cobre; (b) os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados por fontes exógenas ou endógenas, impedindo o ataque aos lipídeos, aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases nitrogenadas do DNA; (c) reparo das lesões causadas pelos radicais relacionados incluindo reversão de danos ocorridos na molécula de DNA e reconstituição das membranas celulares danificadas.

Os compostos antioxidantes exógenos que têm a propriedade de minimizar o estresse oxidativo causado pela exposição à radiação são conhecidos como radiomodificadores e podem ter ação positiva ou negativa. O estudo dos mesmos é de grande interesse tanto para a área da Saúde quanto para a área de Defesa Nacional.

2.7.1 Radiomodificadores: o que são?

Compostos que têm a propriedade de prevenir ou atenuar os efeitos da ionização induzida pela exposição à radiação sobre o organismo, são denominados radiomodificadores. Estes podem ser substâncias capazes de reduzir o efeito da radiação ionizante, especialmente através da catalisação das espécies reativas de oxigênio geradas na interação radiação-tecido. Portanto, dentro da gama de moléculas antioxidantes existentes na natureza muitas podem ter ação protetora contra o estresse oxidativo radioinduzido (Weiss and Landauer, 2003).

O nome dado às substâncias que têm a propriedade de reduzir efeitos químicos decorrentes da interação da radiação ionizante com o tecido biológico é *radioprotetor*. Entretanto, esta denominação não é apropriada. Um radioprotetor deveria proteger o alvo (o material biológico) da interação e não dos efeitos. Assim, um elemento radioprotetor deveria a principio, conferir blindagem, o que definitivamente não ocorre com as substâncias ditas radioprotetoras. O que de fato acontece na ação de uma substância denominada radioprotetora é a redução, ou de forma ideal anulação, dos efeitos químicos radioinduzidos sobre o material biológico. Por este motivo, a denominação mais apropriada é o termo radiomodificador. Alguns trabalhos recentes já utilizam tal denominação (Iarmonenko, 1995; Neklasova et al., 2006) embora o termo radioprotetor deverá persistir ainda por algum tempo. A Figura 8 mostra um esquema geral da evolução temporal dos efeitos biológicos da radiação ionizante sobre o organismo humano.

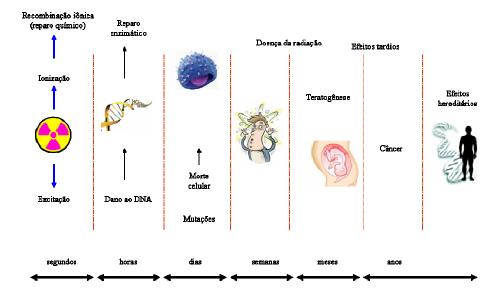


Figura 8 – Evolução temporal dos efeitos bilógicos da radiação ionizante

Radiomodificadores devem apresentar algumas características importantes (Maisin, 1998): (a) proteção contra produtos e subprodutos da interação da radiação ionizante com o tecido, (b) apresentar um efeito geral de proteção sobre a maioria dos órgãos, (c) apresentar baixa toxicidade e maior janela temporal de proteção possível, (d) a via de administração da droga deve ser simples e de preferência oral ou, se for o caso, intramuscular e (e) deve apresentar compatibilidade com outras drogas a serem administradas durante o tratamento.

Um conceito importante definido na pesquisa em radiomodificadores é o de fator de redução de dose (FRD). É definido como a razão entre a dose de radiação necessária para se produzir um mesmo efeito biológico na presença e na ausência da droga radiomodificadora e pode ser representado por

$$FRD = \frac{efeito_na_presença_(droga)}{efeito_na_ausência_(droga)}$$
(12)

Estima-se que os radiomodificadores mais eficientes devem apresentar valor para o Fator de Redução de Dose (FRD), entre 2 e 2,7. Dentre as moléculas consideradas radiomodificadoras, as que possuem grupo sulfidril (-SH), por exemplo a cisteína $(C_6H_{12}N_2O_4S_2)$, que foi testada pela primeira vez em 1948 (Patt et al., 1949), foi observada a capacidade de reduzir efeitos da irradiação de corpo inteiro em camundongos. A partir destas

investigações muitos estudos realizados identificaram e/ou desenvolveram mais de 300 compostos. Entre estes o composto sintético denominado Amifostina (WR2721) (Khodarev et al., 2004) vem se mostrando muito eficiente.

A Amifostina é o único composto autorizado hoje para utilização em humanos com fim radiomodificador e somente para tratamento de neoplasias na região de cabeça e pescoço (Cassatt et al., 2002). É uma droga na qual o grupo tioéster é clivado pela enzima fosfatase alcalina da membrana produzindo um grupo tiol ativo livre, denominado WR1065. Este produto metabólico é produzido em altas concentrações em células saudáveis e em menor concentração nas células tumorais. A Amifostina provoca um efeito protetor seletivo chegando a um fator de redução de dose (FRD) igual a 2,7 (Mazur, 2000).

A presença de grupos sulfidril ou outros com atividade de varredura (*scavenger*) pode também fornecer certo grau de proteção. Entretanto, devido ao fato de que os radicais livres têm uma meia-vida extremamente curta o ideal seria que compostos radiomodificadores fossem administrados antes da irradiação com um intervalo temporal suficientemente grande que possibilitasse a devida proteção. Um intervalo temporal curto entre a ingestão de um radiomodificador e a exposição à radiação ionizante tem pouca finalidade se o objetivo é obter uma ação protetora. Assim, é desejável que a molécula ou alimento radiomodificador tenha ação longa o suficiente para alcançar o momento futuro da produção de radicais livres. Também se pode considerar a possibilidade de administração crônica, o que implica em dificuldades de administração exceto pelo desenvolvimento ou descoberta de alimentos com propriedades radiomodificadoras.

Ao longo dos anos foram feitos vários estudos e vários mecanismos foram propostos para descrever a ação radiomodificadora de classes especiais de moléculas, como atividade *scavenger*, de transferência de hidrogênio, de indução de hipóxia e de estabilização de DNA (Cassatt et al., 2002).

2.7.2 Aplicações dos radiomodificadores em Defesa

O grande desafio relacionado à exposição humana a radiação é que tal exposição pode ocorrer de forma planejada ou de modo acidental. A possibilidade de se organizar uma exposição à radiação ionizante de modo planejado e controlado foi um elemento vital para o desenvolvimento de tratamentos oncológicos. Entretanto, a questão que permanece em aberto é se existiriam mecanismos capazes de aumentar a proteção em grupos populacionais suscetíveis à exposição radioativa. O desenvolvimento de suplementos alimentares como radiomodificadores é de relevância científica e tem grande valor para questões relacionadas à Defesa Nacional. A Figura 9 mostra de forma resumida um esquema de algumas possíveis vias de exposição.

Vários acontecimentos envolvendo exposição de massa à radiação ionizante foram notificados em todo o mundo ao longo do século XX e particularmente dois deles merecem especial atenção: O acidente de nuclear de Chernobyl e o radiológico de Goiânia.

O acidente nuclear de Chernobyl, na Ucrânia, ocorreu em abril de 1986, dando um vislumbre do que seria uma catástrofe nuclear de proporções continentais. Houve irradiação externa como resultado da deposição de material radioativo (principalmente ¹³⁷Cs) e da ingestão de radionuclídeos (¹³¹I em leite e vegetais folhosos). A contaminação por ¹³¹I e ¹³⁷Cs formaram as contribuições mais importantes para a dose total a que foi submetida a população.

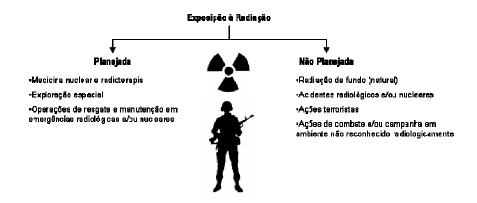


Figura 9 – Exposição planejada e não-planejada à radiação ionizante

No Brasil, o acidente de Goiânia ocorreu em 1987, e envolveu o furto de uma fonte de ¹³⁷Cs de uma unidade de radioterapia em uma clínica fora de serviço. Diversas pessoas que foram expostas ao material radioativo desenvolveram sinais e sintomas clínicos da síndrome aguda da radiação (SAR), síndrome cutânea e/ou contaminação interna.

Radiomodificadores químicos podem oferecer importantes subsídios para o gerenciamento de crise em eventos desta natureza. Entretanto, há ainda um tímido cenário de pesquisa na sua utilização como agentes contramedidas. Um exemplo recente de uso de compostos bioativos em cenários nucleares foi a alimentação especial oferecida aos trabalhadores que responderam à emergência em Chernobyl. Os respondedores foram alimentados com uma dieta especial (biofator antioxidante (AOB) contendo rutina como o ingrediente principal (Emerit et al., 1995; Emerit et al., 1997). O enriquecimento de alimentos com beta-caroteno também foi considerado como uma estratégia viável para a fixação da população no entorno da central nuclear de Chernobyl (Weiss e Landauer, 2003). Em 1998 descobriu-se que a suplementação com β-caroteno reduziu os produtos da peroxidação lipídica em crianças expostas à radiação do reator nuclear de Chernobyl (Ben-Amotz et al., 1998).

Adicionalmente, é importante comentar que estudos correlacionando o efeito da dieta e a incidência de câncer de bexiga em sobreviventes do bombardeio nuclear no Japão sugeriram que o consumo elevado de vegetais de cores verde e/ou amarela, além de frutas eram fatores de proteção contra o câncer de bexiga (Nagano et al., 2000). Em 1996, rebeldes chechenos depositaram um recipiente contendo ¹³⁷Cs em um parque de Moscou e considerase que o incidente é um marco do terror radiológico mundial. Em 2006 o assassinato de Alexander Litvinenko, um ex-agente do serviço secreto da antiga União Soviética, utilizando o ²¹⁰Po, um elemento radioativo, mostrou o quão perigoso pode ser o enfrentamento de um cenário de terror radiológico.

Estudos com a finalidade de mitigar efeitos radiológicos em cenários tanto relacionados ao terror como a acidentes radiológicos e nucleares são necessários. No Brasil a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e seus órgãos subordinados executam pesquisa aplicada à Radioproteção e Radiobiologia, seguida de outras poucas universidades brasileiras e alguns centros de pesquisa.

Diante do potencial enfrentamento das mais diversas situações envolvendo radiações ionizantes, fica evidente a necessidade de se desenvolver radiomodificadores para utilização por equipes de emergência normalmente constituídas por profissionais voluntários, policiais

militares e membros das Forças Armadas. Entretanto, é importante observar que há fundamental diferença conceitual quando se compara envolvimento de civis e militares em operações radiológicas e/ou nucleares. Esta diferença reside no fato de que o potencial cenário radiológico /nuclear a ser enfrentado pode ser subconjunto do cenário de operações militares. Seria razoável o uso de radiomodificadores tendo padrão a ação militar em ambiente radiológico. Isto pode ser sustentado pelo argumento de que os militares estão mais propensos a estresse anterior e posterior ao evento radiológico potencializando efeitos negativos da exposição à radiação. Ou seja, a ação militar segue com insalubridade (Figura 10) simultânea.

Tais relatos sugerem que a utilização de compostos bioativos de origem vegetal podem fornecer um apoio relevante ao processo decisório envolvendo emergências radiológicas e/ou nucleares. Entretanto, não existe um radiomodificador ideal para uso militar (Giambarresi, 1987). Há uma lista de possibilidades que chegou a cerca de 4000 compostos. Embora poucos grupos de pesquisa atuem nesta área, a lista de possibilidades vem sendo constantemente atualizada (Coleman et al., 2003).

De forma consensual, um radiomodificador positivo ideal para uso em operações de Defesa deve possuir o maior número possível de características dentro das listadas a seguir: (a) reduzir o efeito da dose de radiação que produz a ineficácia para a continuidade da operação ou combate; (b) oferecer uma proteção duradoura (vários dias); (c) possuir poucos (ou nenhum) efeitos colaterais e baixa (ou nenhuma) toxicidade; (d) ser altamente protetor e eficaz em nível orgânico; (e) proteger todas as populações em risco; (f) render proteção contra efeitos imediatos e tardios devido a diferentes tipos de radiação.

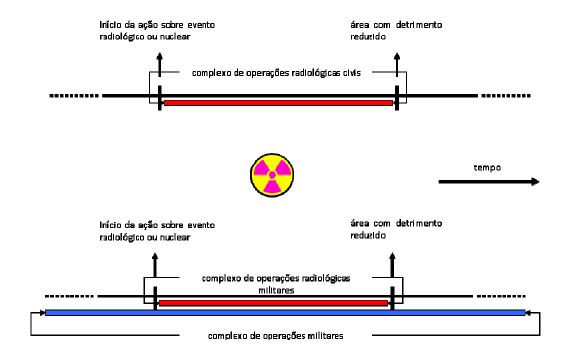


Figura 10 – Vinculação espaço temporal para o complexo de operações militares e civis em ambiente radiológico ou nuclear

Além disso, tal radiomodificador deve ser: (a) seguro para ser ingerido em doses repetidas e ser facilmente administrável (comprimido, inalador, adesivo ou alimento); (b) ser rapidamente absorvido; (c) ser eficaz, mesmo após doses repetidas; (d) ser quimicamente estável à temperatura ambiente e (e) possuir durabilidade. Estas características aproximam o radiomodificador de um alimento funcional. A Figura 11 resume a utilização de um radiomodificador em ambiente operacional.

A exposição à radiação ionizante pode comprometer significativamente as operações militares. Mesmo baixas doses de exposição à radiação podem levar a um *déficit* motor e cognitivo dos indivíduos expostos. Vários medicamentos de base fitoterápica têm sido utilizados para a prestação de radioproteção comportamentais, podendo-se citar a hortelã-pimenta e gengibre que apresentaram resultados promissores (Haksar et al., 2006).



Figura 11 – Aplicação de radiomodificadores em Defesa

Porém, os radiomodificadores atualmente disponíveis no arsenal da maioria dos exércitos do mundo não são adequados para aplicações em campo e a pesquisa em diferentes partes do mundo, muitas vezes é conduzida de forma isolada e secreta em função de seu caráter estratégico. Estas pesquisas visam o desenvolvimento de agentes com a finalidade de contramedida para radiação principalmente para uso militar. Assim, pode-se dizer que a pesquisa acerca de componentes bioativos como potenciais agentes radiomodificadores é estratégica.

Embora o mecanismo preciso pelo qual os radiomodificadores atuem ainda esteja longe de ser elucidado, há um conjunto de ações, que reunidas, podem gerar um perfil aproximado deste conjunto de reações responsável pela radioproteção biológica (Arora et al., 2005): (a) aumento de antioxidantes como glutationa, (b) quelação de metais, (c) reparo do DNA; (d) resposta antiinflamatória; (e) redução da formação de espécies reativas; (f) redução da peroxidação lipídica e oxidação protéica; (g) indução de hipóxia; (h) proliferação celular aumentada; (i) estabilização do potencial de membrana plasmática e mitocondrial; (j) modulação da expressão de proteínas associadas à apoptose.

À partir de evidências prévias publicadas na literatura parece que, entre os alimentos naturais, a uva e seus produtos seria um possível alimento candidato a radiomodificador.

2.8 Antioxidantes naturais: o suco de uva orgânica como radiomodificador

Compostos existentes naturalmente na dieta humana podem prover antioxidantes funcionais como os flavonóides, minerais e enzimas. A redução do estresse oxidativo

promovido por estas substâncias atribui certo grau de proteção contra efeitos deletérios da radiação ionizante interagindo sobre a célula, que se traduz na redução de dano e consequente redução de risco futuro de desenvolvimento de doenças relacionadas. Antioxidantes provenientes da dieta normal humana oferecem um primeiro, mas decisivo benefício, que é uma boa relação custo benefício. A amifostina, por exemplo, tem alto grau de proteção a oferecer, mas tambem oferece alto grau de toxicidade para doses que seriam potencialmente protetoras contra efeitos nocivos da exposição à radiação ionizante. Assim, compostos alternativos naturais, que promovam redução do efeito de dose (alto FRD) além de ter baixa ou nenhuma toxicidade estão hoje sendo mais intensamente investigados, embora apresentem menores fatores de proteção (Emami et al., 2007).

Como os antioxidantes naturais são componentes presentes nos alimentos naturais ou processados, e que apresentam propriedades e funções definidas para a saúde humana, cabe aqui uma breve consideração sobre as definições de alimento funcional e nutracêutico. Alimento funcional é aquele que deve se apresentar na forma de consumo final ao usuário, produzir benefícios à saúde de forma específica, como a redução de riscos de doenças, e serem consumidos como parte da dieta. De outra forma, os alimentos nutracêuticos são alimentos ou parte de alimentos que apresentam benefícios à saúde, incluindo prevenção e/ou tratamento de doenças. Incluem-se ai suplementos na forma de cápsulas, tabletes etc. Antioxidantes como a glutationa e selênio, assim como os microorganismos GRAS (Generally Recognized as Safe) são utilizados amplamente (Andlauer, 2002).

Dentre as propriedades desejáveis de um nutracêutico com efeitos de prevenção ou atenuação da radiotoxicidade encontra-se a sua ação nutrigenômica. Esta ocorre através da interação dos compostos alimentares no genoma como um todo ou através da sua interação com genes específicos (Kaput et al., 2005).

No Brasil a regulamentação dos alimentos funcionais é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através das resoluções 16 a 18 de 30 abril de 1999. Os alimentos funcionais podem ser classificados quanto a origem: (a) animal e (b) vegetal, e quanto ao benefício que proporciona: (a) sistema gastrointestinal, (b) sistema cardiovascular, (c) metabolismo de substratos, (d) crescimento, desenvolvimento e proliferação celular, (e) comportamento fisiológico e (f) antioxidantes. A tabela 2 mostra resumidamente as diferenças básicas nos conceitos de alimento funcional e nutracêutico (Andlauer, 2002).

Tabela 2 – Diferenças básicas entre alimentos funcionais e nutracêuticos.

Alimento	Alvo	Forma	
Funcional	Redução de risco	Alimento comum	
Nutracêutico	Prevenção e tratamento	Suplemento dietético	

Recentes estudos vêm mostrando as potencialidades da uva e seus subprodutos como radiomodificadores (Andrade et al., 2008; Carsten et al., 2008) apresentando atividade hepatoprotetora tanto para dano radioinduzido (Andrade et al., 2008) como contra danos motivados por indução química (Caroline Dani, 2008). Entre os antioxidantes presentes na uva, os compostos mais ativos são os grupos fenólicos, como os flavonóides, apresentando alta atividade de depuração de moléculas citotóxicas (*scavenger*) (Decker, 1997).

Os flavonóides são um grupo de componentes polifenólicos encontrados em grande quantidade nas frutas e nos vegetais. O termo flavonóide é derivado do latim *flavus* que significa amarelo recebendo este nome por ter sido encontrado originalmente em alimentos de coloração amarelada. Formados pela combinação dos aminoácidos fenilalanina e tirosina com unidades acetato, apresentam inúmeras variedades com seis grupos principais classificados como: (a) flavanonas, (b) flavonas, (c) flavonóis, (d) isoflavonóides, (e) antocianinas e (f) flavans (Cotelle 2001). Os flavonóides mais investigados são: (a) quercetina, (b) miricetina, (c) rutina e (d) naringenina (Hartman e Shankel, 1990).

A ingestão diária média destes compostos por humanos no ocidente é da ordem de pouco mais de 20 mg/dia (Hertog et al., 1993). O crescente interesse em investigar os flavonóides é impulsionado pelo fato de apresentem efeito farmacológico sobre algumas doenças, como conseqüência de maior atividade *scavenger*, podendo levar a um estado de maior efetividade funcional das enzimas antioxidantes (van Acker et al., 1996). A estrutura dos flavonóides confere propriedade antioxidante e capacidade de atuar frente aos radicais livres, porque possuem múltiplas hidroxilas ligadas aos grupos aromáticos (Cao et al., 1997).

Outra característica interessante apresentada pelos flavonóides é a capacidade de participar da sinalização molecular intracelular, podendo modular as ações celulares, bem como a ação de vias sinalizadoras, ações nas vias enzimáticas intracelulares e efeito benéfico no tratamento de doenças crônicas, como as que afetam o sistema nervoso em relação à plasticidade celular nervosa (Williams et al., 2004).

Pela ação dos radicais livres sobre a membrana plasmática, Saija e colaboradores (1995) questionaram qual seria o antioxidante que teria um efeito protetor sobre a membrana plasmática celular. A quercetina, que é o flavonóide mais abundante no suco de uva, parece ser eficaz, atuando sobre os radicais livres, principalmente contra o •OH e o O2• (Saija et al., 1995). A quercetina é encontrada na alimentação e lhe é atribuída uma excelente resposta antioxidante (Rice-Evans and Miller, 1996).

A ação antioxidante da quercetina pode ser explicada por sua participação em inibir enzimas como a ciclooxigenase, lipoxigenase e xantina oxidase que estão envolvidas na citotoxicidade oxidativa (Cotelle, 2001). Estudos utilizando quercetina *in vivo* demonstraram que seus metabólitos exibiram atividade antioxidante, com redução na peroxidação lipídica e atuando no sistema de detoxificação através das defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas no fígado (Prior, 2003). Outros estudos também demonstraram a ação protetora da quercetina na isquemia/reperfusão hepática e renal com os mesmos efeitos antioxidantes (Polat et al., 2006; Yadav et al., 2009). Apresenta ainda maior efetividade quando comparada com a vitamina C na inibição dos danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ no DNA de linfócitos humanos (Noroozi et al., 1998). Entretanto, este antioxidante pode reagir com ferro e tornarse um pró-oxidante (Liu et al., 2009).

A uva e seus produtos (principalmente o vinho) estão entre os alimentos mais bem investigados quanto às suas propriedades funcionais (Yadav et al., 2009). Entretanto, parece que produtos não alcoólicos como suco de uva também apresentam propriedades bioativas que tem impacto positivo na saúde humana. Estudos baseados em evidências epidemiológicas e experimentais mostraram que os compostos polifenólicos presentes na uva, incluindo o suco, principalmente o resveratrol e a quercetina (Meng et al., 2004; Schlachterman et al., 2008), apresentam propriedades antioxidantes (Caroline Dani, 2008), antitumorais (Kaur, 2008; Kaur, 2009), antiinflamatórias (Udenigwe et al., 2008), antimutagênicas (Llópiz, 2004), hepatoprotetoras (Dani, 2008), cardioprotetora (Leifert, 2008) entre outras.

Dani e colaboradores (2008) mostraram, em trabalho recente, que a ingestão de suco de uva negra, em especial do suco orgânico, induz uma melhora na capacidade antioxidante hepática quando comparado ao suco convencional e que esta pode ser uma importante questão para novas investigações na área de bioquímica de alimentos funcionais. Em outro experimento do mesmo grupo (Caroline Dani, 2008) foi demonstrado que a atividade antioxidante hepática está significativamente correlacionada com os teores de polifenóis presentes no suco de uva negra. Estes resultados sugerem que ambos os sucos de uva

(convencional e orgânico) têm propriedades antioxidantes poderosas e com forte correlação com o alto teor de compostos fenólicos presentes.

Entretanto, estudos relacionando compostos e alimentos à base de uva e aspectos de radioproteção até o presente momento, limitam-se ao efeito de polifenóis extraídos da semente deste fruto. Apesar disto os resultados são alentadores e sugerem efeitos radioprotetores ou atenuadores da radiotoxicidade (Mantena and Katiyar, 2006; Enginar et al., 2007; Cetin et al., 2008; Saada et al., 2009).

Como tais pesquisas estão direcionadas para o desenvolvimento de compostos farmacológicos, existe a necessidade da ampliação de estudos para averiguar se as propriedades nutracêuticas e/ou funcionais do suco de uva poderiam incluir efeitos radiomodificadores.

Tais estudos seriam relevantes para o desenvolvimento de estratégias que previnam ou atenuem a radiotoxicidade das radiações ionizantes em qualquer estágio de exposição aguda de corpo inteiro que são de grande interesse na área cientifica, clinica, da Defesa Pública e operações militares. Dentro desta perspectiva, a hipótese de que a ingestão moderada de produtos não-alcóolicos da uva, como o seu suco, também possuiriam propriedades radiomodificadoras precisa ser investigada. Tal hipótese representa o principal objeto de estudo do trabalho de tese aqui apresentado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do suco de uva (vitis labrusca, bordô) sobre indicadores fisiopatológicos e bioquímicos da síndrome aguda da radiação em ratos Wistar

3.2 Objetivos específicos

Em ratos submetidos ou não à radiação ionizante e tratados ou não com suco de uva após 15 dias da exposição:

- Comparar o peso total, principal indicador da SAR, e parâmetros hematológicos
- Identificar o órgão com maior resposta biológica à exposição à radiação, através da análise do seu peso
- Comparar, no órgão com maior resposta biológica:
 - → Alterações histológicas
 - → Alterações em marcadores bioquímicos do estresse oxidativo
 - → A modulação de marcadores de reparo do DNA e apoptose
 - → Indicação de genotoxicidade

4- ARTIGOS CIENTÍFICOS

A parte experimental desta tese foi conduzida nas dependências do Biotério e Departamento de Biomedicina da *Univeridad de León* (Espanha) subsidiada por bolsa de doutorado sanduiche (CAPES-DGU).

Os resultados estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos. O artigo 1 está disposto na forma que foi publicado na revista científica *Nutrición Hospitalária*. O artigo 2 está disposto na forma do manuscrito submetido à revista científica *International Journal of Radiation Biology*.

4.1 – EFEITO RADIOMODIFICADOR DA SUPLEMENTAÇÃO COM SUCO DE UVA ORGÂNICA SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, PESO DE ÓRGÃOS E CORPORAL EM RATOS IRRADIADOS COM RAIOS-X

Artigo 1

RADIOMODIFYING EFFECT OF ORGANIC GRAPE JUICE SUPPLEMENTATION ON HEMATOLOGICAL PARAMETERS AND ORGAN WEIGHT IN WHOLEBODY X-IRRADIATION IN RATS

E. Ramos de Andrade, J. Da Costa Escobar Piccoli, I. B. Mânica da Cruz, J. B. Teixeira Rocha, E. Garzo, R. Marina, J. L. Mauriz, P. González and J. P. Barrio

Nutr Hosp. 2009;24(3):297-303 ISSN 0212-1611 Nutrición Hospitalaria Nutr Hosp. 2009;24(3):297-303 ISSN 0212-1611 - CODEN NUHOEQ S V D 318

Original

Radiomodifying effect of organic grape juice supplementation on hematological parameters and organ weight in whole-body X-irradiation in rats

E. Ramos de Andrade², J. Da Costa Escobar Piccoli², I. B. Mânica da Cruz², J. B. Teixeira Rocha², E. Garzo¹, R. Marina¹, J. L. Mauriz¹, P. González¹ and J. P. Barrio¹

Instituto de Biomedicina. Centro de Investigaciones Médicas en Red: Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD).

Departamento de Ciencias Biomédicas. Univesidad de León. Spain. *Centro de Ciências Naturais e Exatas, Ciências Biológicas.

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria RS. Brazil.

Abstract

The aim of this study is testing black grape juice as a radiomodifier against whole body X-irradiation using an animal model. Sixteen male Wistar rats were divided into four groups where two were irradiated by X-rays from a 200 kV machine specially designed to biological samples. Animals were fed ad libitum and drank voluntarily 2-10 ml a day of grape juice or placebo (isocaloric glucose and fructose solution) for one week before and two weeks after 6 Gy X-irradiation when they were sacrificed. Results have shown a significant liver weight loss in irradiated placebo group only while grape juice one has presented no losses. Hematological analysis showed typical abnormalities for ionizing radiation exposure, including early leucopenia and anemia. The intake of grape juice induced an increase in granulocyte percent count.

(Nutr Hosp. 2009;24:297-303)

Key words: X-rays. Black grape juice. Radiomodifier. Rats.

EFECTO RADIOMODIFICADOR DE LA SUPLEMENTACIÓN CON MOSTO DE UVA DE CULTIVO ECOLÓGICO SOBRE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS Y PESO DE ÓRGANOS EN RATAS SOMETIDAS A IRRADIACIÓN DE CUERPO ENTERO CON RAYOS X

Resumen

El proposito de este estudio fue comprobar el efecto radiomodificador del mosto tinto de uva frente a irradiación de cuerpo entero con rayos X usando un modelo animal. Dieciséis ratas macho de raza Wistar fueron irradiadas mediante un aparato de 200 kV diseñado específicamente para muestras biológicas. Los animales fueron alimentados ad libitum y bebieron cada dia voluntariamente entre 2 y 10 ml de mosto de uva o placebo (solución isocalórica de glucosa y fructosa) durante una semana antes y dos semanas después de irradiación con rayos X a una dosis de 6 Gy, momento en que fueron sacrificadas. Los resultados mostraron una pérdida significativa de peso hepático en los animales irradiados tratados con placebo, mientras que los tratados con mosto presentaron valores similares a los controles no irradiados. El análisis hematológico presentó las anomalías típicas de la exposición a radiación ionizante, con disminución leucocitaria temprana y anemia. La ingestión de mosto de uva indujo un aumento del porcentaje de granulocitos.

(Nutr Hosp. 2009;24:297-303)

Palabras clave: Rayos X. Mosto tinto de uva. Radiomodificador. Ratas.

Correspondence: Juan Pablo Barrio Lera. E-mail: jpbari@unileon.es

Recibido: 5-II-2009. Aceptado: 6-III-2009.

Introduction

The use of ionizing radiation for a wide range of purposes has been growing up rapidly since the nuclear holocaust. Nuclear and radiological technologies have spread over most of knowledge fields, from Engineering to Health Sciences, even though its uses can be controversial and a bottleneck on radiation protection is a problem to be solved. Exposure to ionizing radiation can be harmful and searching for radiomodifiers (drugs or nutrients) has full epidemiological relevance. The ideal radioprotective agent (radiomodifier) must provide: a) significant protection against radiation effects; b) a general protective effects to all other organs including non-target ones (in case of therapy); c) acceptable route of administration (oral is preferred); d) low toxicity; e) compatibility for use with other drugs.12 Radiomodifiers are substances able to reduce the effect of the ionizing radiation strike, but unable to stop it. Their action is neither like a barrier nor shielding for ionizing radiation, but as scavengers for reactive oxygen species. Clinically relevant radiomodifier substances should have low or none toxicity and synergic action with other drugs. Dealing with these purposes the best option is a functional food or nutraceutical. Unfortunately, there is no compound that manifest all these properties at a time and among more than 300 radiomodifiers developed,2 amifostine (WR2721, Ethyol) has proved as most efficient but only authorized for radiotherapy treatment of head and neck cancer.34 Natural compounds in human diet could provide functional antioxidants, such as vitamins, minerals and enzymes acting as radiomodifiers on reducing oxidation damage caused by ionizing radiation exposure. An example is the use of vitamin E for recovering post-irradiation procedures showing good results.57 Radiation exposure might be heterogeneous in terms of dose, dose rate and quality, depending on the type of the radiation source released and the location of the subject on site. Therefore, methods are needed to protect against and treat a wide range of early and later developing radiation-induced injuries. Acute effects of the exposure to ionizing radiation mainly include immune suppression, hematopoietic cell loss, mucosal damage, and potential injury to other sites such as lung, kidney, liver and central nervous system. Liver plays a particular role in radiosensitivity and as a consequence of its redundant, parallel functional structure, liver is able to deal with high radiation dose as long as only partial irradiation occurs; otherwise, whole organ irradiation leads to hepatocyte failure and RILD (Radiation Induced Liver Disease) such as hepatitis might be installed.9

Long-term effects include dysfunction, fibrosis and cancer in a wide range of organs and tissues. Blood counts can help to manage the decision-making process in clinical decisions. The hematopoietic syndrome is significantly important to partial-body or whole-body ionizing radiation exposures exceeding 1Gy. Irradiation of bone marrow stem and progenitor cells at increasing doses results in exponential cellular death. Mitotically active

hematopoietic progenitors have a limited capacity to divide after a whole-body radiation dose greater than 2 or 3 Gy.11 After exposure, a hematologic crisis might lead to: a) predisposition to infection, b) bleeding, and c) poor wound healing, among others. A predictable decline in lymphocytes occurs after irradiation, and in fact, there is a 50% decline in absolute lymphocyte count within the first 24 hours after exposure, followed by a further, more severe decline within 48 hours.12 The predictability of the rate of lymphocytic depletion count, which characterizes a potentially lethal exposure, has led to the development of a model using lymphocyte depletion kinetics (Andrew's curve) as a biodosimetric tool.13-14 The rate of decline of the absolute lymphocyte count over the initial 12 hours and for a week after exposure is a function of cumulative dose15 and the lymphocyte depletion kinetics predicts dose assessment for a photon-equivalent dose range within 1 and 10 Gy, range in which most of the radiobiological effects take place. For an optimal screening and a good support for clinical decision-making process a complete blood cell count with leukocyte differential should be obtained immediately after exposure, 3 times per day for the next 2 to 3 days, and then twice per day for the following 3 to 6 days. However, it is recommended at least 3 complete blood counts with differential within the initial 4 days after exposure to calculate a slope for lymphocyte decline for estimating the exposure dose. The onset of other cytopenias varies depending on both dose and dose rate and granulocyte counts may transiently increase before decreasing in exposures less than 5 Gy in humans.16 This behavior, termed an abortive rise, is a transient increase in the absolute number of cells in any compartment of a nearly depleted hematopoietic cell renewal system, and may indicate a survivable exposure.16

The probability of occurrence of those effects can be minimized or altered by the radiomodifier action. Several evidences suggest that grape juice and seeds can provide protection levels against exposure to ionizing radiation. Radiobiological effects of ionizing radiation are a brand new issue of Science and have been taking noticeable advances over the last 60 years. However, most of the effort made has been facing a hard pathway, bordering other fields such as Biochemistry, Molecular Biology and Medicine, which turns Radiobiology out a complex field to be explored.

The present work is aimed to test black grape juice as a radiomodifier against whole body X-irradiation using rats as an animal model in order to assess the possible changes in bodily and hematological parameters.

Materials and Methods

Animals

Sixteen male Wistar rats weighing 200-250 g (Harlan, Barcelona, Spain), housed at the animal house of University of León (Spain), were included in the study. The experimental protocol used was approved by the University of León Ethical Committee, and adhered to the European Community Guiding Principles for the Care and Use of Animals.

Whole Body Irradiation

Animals were divided into four groups: (MN) nonirradiated, grape juice supplemented; (GN) non-irradiated, placebo (isocaloric glucose plus fructose) supplemented; (MR) irradiated, grape juice supplemented, and (GR) irradiated, placebo (isocaloric glucose/fructose solution) supplemented. In order to immobilize the animals, anesthesia was induced by intraperitoneal administration of pentobarbital 0.6% in saline (10 ml/kg body weight), at noon, 15 minutes before irradiation, ensuring the loss of palpebral and plantar reflex activity and spontaneous respiration throughout the procedure. The animals were placed in decubitus pronus on a plexiglas board, so that four animals would be irradiated at a time and exposed to a single dose of 6 Gy of whole body X-irradiation from an X-ray machine (200 kV) MAXISHOT 200 (YXLON, Copenhagen, Denmark), at a radiation dose rate of 0.40 Gy/min, with a source-skin distance (SSD) of 50 cm.

Food and Drink

Animals were fed according to a standard rat chow diet, having free access to ad libitum water and food. After one week adaptation to individual cages, they were allowed to ingest a maximum of 10 ml of test compound (grape juice) or placebo, depending on their assigned group. Environmental conditions were controlled (12-hour photoperiod and 20 ± 2 °C) throughout the experimental period.

Grape juice and placebo composition

Ecologically-produced (organic) black grape juice was obtained from the city of Garibaldi (Rio Grande do Sul, Brazil), in the main grape-growing region of the state. Grapes were cultivated in 2007 and the juice was prepared the same year. The concentration (mg/L) of phenolic compounds in the grape juice was determined as follows: Resveratrol 3.95 ± 0.01, Quercetin 8.95 ± 0.09, Rutin 3.75 ± 0.03, Gallic acid 81.07 ± 2.03, Caffeic acid 30.28 ± 2.00, Flavonoids 0.249 ± 0.002. Placebo solution was made using an equimolar mixture of glucose and fructose to be isocaloric with the sugar composition in the grape juice (95 g/L).

Blood samples collection

Blood samples were collected at 6, 24, 48 hours and 16 days following X-ray exposure using heparinized capillaries by puncturing the retro-orbital plexus after prior mild anesthesia with isofluoran.

Table I

White cell counts obtained at 6, 24, 48 hours, and 16 days after whole-body X-irradiation of 6 Gy in male Wistar rats

Time/Group		Leukocytes (x 10°/L)	Lymphocytes (x 10°/L)	Monocytes (x 10°/L)	Granulocytes (x 10°/L)
	MN	8.21 ± 0.82	4.76±0.94	0.25±0.08	3.20±0.69
cu	MR	3.62 ± 0.59 *#	1.00 ± 0.27 *#	0.25 ± 0.06	2.40 ± 0.33
6 h	GR	$4.19 \pm 0.97 *#$	$1.39 \pm 0.39 *#$	0.25 ± 0.06	2.54 ± 0.62
	GN	9.22 ± 1.45	6.46 ± 1.42	0.24 ± 0.11	2.52 ± 0.16
Ž.	MN	9.1 ± 0.96	7.12 ± 0.78	0.24±0.06	1.76±0.38
241	MR	1.1 ± 0.08 *#	0.25 ± 0.03 *#	0.10 ± 0.01 *#	0.73 ± 0.07 *#
24 h	GR	0.7 ± 0.12 *#	0.18 ± 0.05 *#	0.06 ± 0.01 *#	0.48 ± 0.06 *#
	GN	10.2 ± 1.78	8.24 ± 1.52	0.28 ± 0.02	1.71 ± 0.66
	MN	9.34 ± 1.41	8.07 ± 1.16	0.11±0.03	1.16±0.26
40.1	MR	0.55 ± 0.04 *#	0.11 ± 0.01 *#	$0.04 \pm 0.01 \#$	0.40 ± 0.04*#
48 h	GR	0.81 ± 0.32*#	0.39 ± 0.18 *#	$0.06 \pm 0.04\pi$	0.37 ± 0.11*#
4.0	GN	7.37 ± 0.84	5.78 ± 0.54+	0.33 ± 0.13+	1.27 ± 0.41
	MN	3.22 ± 0.47	2.38 ± 0.68	0.03 ± 0.01	0.81 ± 0.31
	MR	0.67 ± 0.09 *#	0.50 ± 0.07 *#	0.02 ± 0.01	0.14 ± 0.03*#
16 d	GR	0.46 ± 0.12 *#	0.40 ± 0.05 *#	0.02 ± 0.01	0.15 ± 0.07 *#
	GN	3.68 ± 0.39	2.84 ± 0.27	$0.09 \pm 0.03 *$	0.75 ± 0.20

MN (grape juice only), MR (grape juice + X-irradiation), GR (placebo + X-irradiation) and GN (placebo only).

Means ± s.e.m. of 4 animals per group. Significant differences from non-irradiated groups at p< 0.05 (Newman-Keuls test) are indicated as *(MN) and #(GN).

299

Table II

Relative (%) hematolopical parameters obtained at 6. 24. 48 hours, and 16 days after whole-body X-irradiation of 6 Gy in male Wistar rats

Time/Group		Lymphocyte (%)	Monocyte (%)	Granulocyte (%)
	MN	57.0±9.8	2.85 ±0.76	40.1 ± 10.3
61	MR	26.2 ± 5.5+#	$6.45 \pm 0.66 *#$	67.3 ± 11.6*#
6 h	GR	32.4 ± 2.0+#	7.15 ± 1.88 *#	60.5 ± 3.9 *#
	GN	68.4 ± 4.2	2.95 ± 1.29	28.7 ± 6.2
	MN	78.3±3.7	2.67±0.54	19.0±3.2
241	MR	23.0 ± 2.9+#	8.97 ± 0.85+#	68.0 ± 3.2*#
24 h	GR	22.0 ± 5.2+#	8.32 ± 0.80 *#	69.7 ± 5.3*#
	GN	80.5 ± 4.0	3.13 ±0.78	16.3 ± 4.14
	MN	86.8 ± 1.4	1.18 ± 0.33	12.0 ± 1.26
40.1	MR	19.9 ± 1.3+#	7.58 ± 1.46*#	72.5 ± 1.9*#
48 h	GR	42.4 ± 7.3 * #	5.60 ± 1.40+#	52.0 ± 7.5*#
	GN	79.3 ± 4.8	4.30 ± 1.26	16.4 ± 3.6
	MN	69.3 ± 15.7	2.82±0.22	29.9 ± 15.9
16.1	MR	75.6 ± 2.7	3.23 ± 1.10	21.2 ± 2.0
16 d	GR	72.2 ± 8.5	3.50 ± 1.20	24.4 ± 7.3
	GN	77.7 ± 3.9	2.55 ±0.62	19.8 ± 3.5

MN (grape juice only), MR (grape juice + X-irradiation), GR (placebo + X-irradiation) and GN (placebo only). Means \pm s.e.m. of 4 animals per group. Significant differences from non-irradiated groups at p < 0.05 (Newman-Keuls test) are indicated as *(MN) and #(GN).

Results and discussion

As it can be seen in table I, leukocyte count decreased with significant differences for all samples considering MR and GR groups in relation to controls. Lymphocyte counts fell down dramatically, but they showed a relative recovery for MR group, not seen in GR. This fall in lymphocyte counts may be interrupted by an abortive rise16 followed by final recovery due to the release of damaged blood cells. Monocyte count dropped significantly in comparison to controls only for 24 and 48 hours. Granulocytes decreased, for all sampling times and groups. Erythrocyte count (table III) showed normal values for the first 48 hours and a significant decrease at 16 days after irradiation, indicative that an anemia was installed. Levels of hemoglobin decreased significantly at 48 hours for MR group, and at 16 days in MR and GR, respectively to controls. Although there is absence of statistical significance on hemoglobin levels for MR and GR groups compared each other, at 16 days there is a tendency on keeping higher values for MR group, with higher variability found on GR group. This tendency could be related to the glucose and fructose absorption decrease in small intestine in irradiated rats, with increase in CO, production in peripheral blood leading to an increase of hemoglobin concentration.20,21

Changes in hemoglobin and erythrocyte count are also to be expected after significant damage to bone marrow subsequent to X-irradiation, as shown in a number of studies.^{22,23} At this respect, hematocrit values

were statistically distinguishable for groups MR and GR with respect to controls only at 16 days. Platelet counts have shown statistical significances for MR and GR only for 16 days respectively to controls. Two animals from GR group showed nasal bleeding possibly related to platelet depletion, in contrast to MR group where no bleeding was noticed over the experimental period. Relative counts (%) for lymphocytes (table II), were significantly decreased for MR and GR respectively to controls for 6, 24 and 48 hours but not for 16 days. However, percent counts for monocytes and granulocytes increased at 6, 24 and 48 hours relative to controls. When comparing the X-irradiated groups at 6 and 48 hours post-irradiation, total leukocyte count was higher for GR than MR group (table I). However, the much higher variability appearing in the data from GR group indicates that some caution has to be taken when discarding possible radioprotective effects of grape juice. Percent lymphocyte count was higher on GR than MR, but percent granulocyte count was higher on MR than GR group, which suggest a real possibility of recovering from damaged bone marrow, in agreement with the proposed radioprotective effect of grape juice supplementation over bone marrow. All in all, these results point to massive bone marrow damage as a consequence of whole-body acute X-irradiation, and further experiments should be carried out at different times post-irradiation with direct bone marrow sampling23 to clarify the time course of these radiomodifying effects.

The evaluation of the body weight changes before and after X-irradiation (fig. 1) showed significant dif-

Table III

Hematolovical varameters obtained at 6. 24. 48 hours, and 16 days after whole-body X-irradiation of 6 Gy in male Wistar rats

Time/Group		Erythrocyte (x 10 ⁴ L)	Hemoglobin (x 10 ⁿ /L)	Hematocrit (x 10°/L)	Platelets (x 10º/L)
	MN	8.25 ± 0.02	17.0±0.13	46.8 ± 0.4	735 ± 18
6 h	MR	8.16 ± 0.25	17.0±0.15	47.3 ± 0.6	707 ± 57
	GR	8.44 ± 0.28	17.6±0.27	48.4 ± 0.5	739 ± 57
	GN	8.18 ± 0.06	17.2±0.20	47.5 ± 0.7	730 ± 74
24 h	MN	8.20 ± 0.17	16.5±0.39	45.0 ± 0.6	742±39
	MR	7.78 ± 0.16	15.7±0.27	43.5 ± 0.9	681 ± 67
	GR	7.97 ± 0.17	16.1 ± 0.42	44.3 ± 1.2	668 ± 21
	GN	7.98 ± 0.12	16.5±0.29	44.8 ± 1.0	673 ± 53
48 h	MN	7.82 ± 0.10	16.0±0.23	44.0±0.7	739±47
	MR	7.57 ± 0.12	15.3 ± 0.24#	42.4 ± 0.9	674±75
	GR	8.02 ± 0.19	16.0±0.17	44.8 ± 0.8	553 ± 63
	GN	7.89 ± 0.12	16.0±0.21	43.7 ± 0.5	668 ± 32
	MN	7.50±0.18	15.6±0.27	38.4±0.7	504±39
	MR	$4.69 \pm 0.07 + \pi$	9.6 ± 0.32+#	24.6 ± 0.8*#	66 ± 18*4
16 d	GR	$4.25 \pm 0.86 $	8.2 ± 1.91+#	21.3 ± 4.2+#	80 ± 35 **
	GN	7.83 ± 0.19	16.2 ± 0.30	40.1 ± 1.0	494 ± 16

MN (grape juice only), MR (grape juice + X-irradiation), GR (placebo + X-irradiation) and GN (placebo only).

Means ± s.e.m. of 4 animals per group. Significant differences from non-irradiated groups at p < 0.05 (Newman-Keuls test) are indicated as *(MN) and #(GN).

ferences from the irradiated grape juice group (MR) in comparison to the placebo one, even though both presented significant body weight loss. Non-irradiated groups showed the same growth pattern for both juice and placebo ones. The irradiated grape juice group showed no significant deviation when compared to the non-irradiated one. On the other hand, a significant deviation was found in placebo group after irradiation,

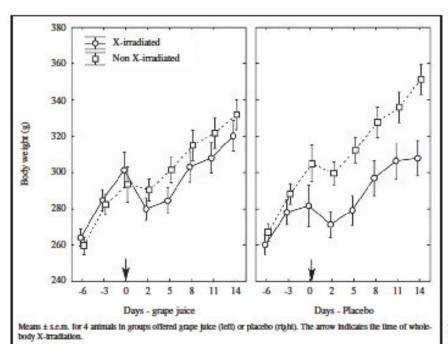


Fig. 1.—Evolution of body weight before and after Xirradiation.

Table IV

Body weight and weight of selected organs (g) 16 days after whole-body X-irradiation of 6 Gy in male Wistar rats

Group	Body weight	Liver	Spleen	Kidneys	Heart	Hepatosomatic index
MN	331.8 ± 2.6	12.2 ± 0.70	0.82±0.02	2.19±0.09	0.93 ± 0.01	3.68 ± 0.19
MR	320.2 ± 8.7	12.3 ± 0.83	0.53 ± 0.03*#	2.07 ± 0.08	1.06 ± 0.04	3.83 ±0.17
GR	307.9 ± 9.5#	9.9 ± 0.46*#	0.54 ± 0.01*#	2.01 ± 0.18	1.08 ± 0.13	3.23 ± 0.06*#
GN	351.3 ± 11.5	12.3 ± 0.45	0.75 ± 0.03	2.29 ± 0.08	1.03 ± 0.01	3.50 ± 0.02

MN (grape juice only), MR (grape juice + X-irradiation), GR (placebo + X-irradiation) and GN (placebo only). Significant differences from non-irradiated groups at p < 0.05 (Newman-Keuls test) are indicated as *(MN) and #(GN).

where a remarkable weight loss took place. The average body weight in the grape juice group was closer to the non-irradiated group than placebo, indicative that grape juice seems to protect against X-irradiation²⁴ over total body weight loss.

Significant differences from non-irradiated groups (table IV) were found for liver, spleen and hepatosomatic index, but not for heart and kidneys, suggestive of a higher radioresistance of these latter tissues, at least on the time window explored here. No liver weight differences were found for MR, MN and GN groups. However, GR showed considerable liver weight loss in comparison to MR and all other groups. Previous reports have shown increased liver weight 6h after X-irradiation in rats25 and abnormalities due to small intestine X-radiation exposure, leading to changes on glycogen levels and liver function. 3,7 The present work shows that there was significant liver weight loss after 16 days for GR group, but not for MR group, which is suggestive of a radioprotective action of black grape juice supplementation. The composition of the ecologically-grown black grape juice shows a high content of bioactive phenolic compounds such as resveratrol, quercetin and rutin,19 and it is tempting to link the radiomodifying actions of black grape juice to these chemicals. Flavonoids are known to have important antioxidant and anti-inflammatory activities.28,28 Resveratrol has been since long studied not only as a potential antioxidant stimulating agent30 and radiomodifier, 24,31 but also because of its anti-mutagen action, its role in mediating anti-inflammatory effects, anti-carcinogenic action by the inhibition of cyclooxygenase and hydroperoxidase activities. E Resveratrol has also been shown to influence the apoptotic effects of cytokines, chemotherapeutic agents, and ionizing radiation.33 Pharmacokinetic studies of resveratrol activity revealed that its main target organs are liver and kidney,33 where its conversion into a sulfated form and a glucuronide conjugate takes place. Nevertheless, quercetin and rutin are per se antioxidant agents and so might be potentially co-responsible for the radiomodifying effect of black grape juice we are starting to see from this study.

It must also be commented out the voluntary nature of black grape juice intake by rats. There was a high individual variability, but all animals from MR and MN groups drank at least 2 ml from a maximum allowable of 10 ml. The placebo solution, on the contrary, was more palatable, with a minimum of 8 out of 10 ml being drank daily. The choice of ceiling for supplement intake was made based on previous considerations of the potential effect of black grape juice on ex vivo studies with human volunteers. Food intake was severely decreased by 63±4% the first day after irradiation, but it increased thereafter, to be totally resumed 5 days post-irradiation, without differences due to grape juice supplementation (data not shown). Water intake increased by 49 ± 5% in all groups, X-irradiated and controls, on the irradiation day, but resumed to normal the next day onwards. This effect was attributed to the anesthesia procedure all animals suffered.

Conclusions

The authors studied the radiomodifier effect of organic grape juice through changes of physiological and hematological parameters in whole body X-irradiated rats. Most of the results are in agreement to the scientific background concerning to non-irradiated groups response and add new, albeit non conclusive, observations. Ecologically-grown grape juice seems to have a radiomodifier effect over selected hematological parameters on whole body X-irradiated rats. The remarkable result was the maintenance of a normal liver weight for MR group, in comparison to GR group, which had become 25% smaller. There is a background support for the idea that glucose and fructose intake is able to induce liver weight gain.27 In spite of this liver weight gain, there are many experimental data supporting the reduction on glucose and fructose absorption by small intestine, which could imply to reduce the amount of sugar reaching to liver, leading to a consequent reduction on its conversion to fat. Non-conclusive effects were found for haematological parameters in relation to the radiomodifying effect of black grape juice intake, albeit percent granulocyte count showed significant increase at 48 hours post-irradiation in MR group. The anemia and leucopenia observed at 16 days post-irradiation are suggestive of significant damage to bone marrow tissue. More detailed experiments must be carried out in order to improve our understanding about the radiomodifying effect of ecological grape juice over blood cells and liver function.

Acknowledgements

This work has been supported by a study-leave grant from CAPES (Brazil) and Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) through the Brazil-Spain cooperation project PHB2007-0071-PC. Additional support from Department of Biomedical Sciences (University of León) is also acknowledged.

References

- Maisin JR. Bacq and Alexander award lecture chemical radioprotection: past, present and future prospects. In J Radiat Biol 1998; 73: 443-450.
- Hosseinimehr SJ. Fondation Review: Trends in the development of radioprotective agents. Drug Discovery Today 2007; 12 (19-20): 794-805.
- Khodarev NN, Kataoka Y, Murley JS, Weichselbaum RR, Grdina DJ. Interaction Of Amifostine And Ionizing Radiation On Transcriptional Patterns Of Apoptotic Genes Expressed In Human Microvascular Endothelial Cells (HMEC). Int J Rad Onc Biol Phys 2004; 60 (2): 553-563.
- Mccumber LM. The Potential Influence Of Cell Protectors For Dose Escalation In Cancer Therapy: An Nalysis Of Amifostine. Medical Dosimetry 2004; 29 (2): 139-143.
- Manzi FR, Boscolo FN, Almeida SM et al. Morphological study of the radioprotective effect of vitamin E (dl-alpha-tocopheril) in tissue reparation in rats. Radiol Bras 2003; 36 (6): 367-371.
- Singh VK, Srinivasan V, Toles R et al. Radiation Protection by the Antioxidant Alpha-Tocopherol Succinate, Human Factors and Medicine Panel Research Task Group 099 "Radiation Bioeffects and Counter-measures" meeting, held in Bethesda, Maryland, USA. 2005.
- Khalil A, Milochevitch C. Study of the antioxidant effect of atocopherol on low-density lipoprotein peroxidation induced at low and high ?-radiation dose rates, Rad Phys and Chem 2005; 72: 347-353.
- Ahmed RG. Damage Pattern as Function of Various Types of Radiations Med J of Islamic World Acad of Sci 2005; 15: 135-147.
- Hall EJ, Giaccia AJ. Clinical Response to Normal Tissues, In: Radiobiology for the Radiologist 2006; chapter 19, p. 349, 6^a
- Walker RI, Cerveny RJ. Medical Consequences of Nuclear Warfare. Falls Church, VA: Office of the Surgeon General, 1989
- Hall EJ, Giaccia AJ. Acute effects of total-body irradiation. In: Hall EJ. Radiobiology for the Radiologist. 2006; chapter 8, p. 349.6° ed.
- Waselenko JK, MacVittie TJ, Blakely WF et al. Strategic National Stockpile Radiation Working Group. Medical management of the acute radiation syndrome: recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group. Annals of Internal Medicine 2004; 140: 1037-51.
- Goans RE, Holloway EC, Berger ME, Ricks RC. Early dose assessment following severe radiation accidents. Health Phys 1907: 72: 513.8
- Baranov AE, Guskova AK, Nadejina NM, Nugis VY. Chernobyl experience: biological indicators of exposure to ionizing radiation. Stem Cells 1995; 13 (Supl. 1): 69-77.

- Goans RE, Holloway EC, Berger ME, Ricks RC. Early dose assessment in criticality accidents. Health Phys 2001; 81: 446-9.
- Fliedner TM, Friesecke, I, Beyrer K. Organ specific manifestations of the acute radiation syndrome, in: Medical Management of Radiation Accidents: Manual on the Acute Radiation Syndrome. Oxford: British Institute of Radiology; 2001 (3): 13-38.
- Carsten RE, Bachand AM, Bailey SM, Ullrich RL. Resveratrol reduces radiation-induced chromosome aberration frequencies in mouse bone marrow cells. Radiat Res 2008; 169 (6): 633-8.
- Creager ANH, Santesmases MJS. Radiobiology in the Atomic Age: Changing Research Practices and Policies in Comparative Perspective, Journal of the History of Biology 2006; 39: 637-647.
- Machado MM, Santos GFF, Rocha MIÜ, Andrade ER et al. Phenolic Content and Antioxidant Effect of Red Grape Juices and Wine Vinegars from Organically or Conventionally produced grapes, Food Chemistry 2009 (in press).
- Hill R, Kiyasu J, Chaikoff IL. Metabolism of Glucose and Fructose in Liver of the Rat Subjected to Whole-Body X-Irradiation, Am J Physiol 1956; 187: 417-421.
- Farrar JT, Small MD, Bullard D, Ingelfinger FJ. Effect of Total Body Irradiation on Absorption of Sugars From the Small Intestine. Am J Physiol 1956; 186: 549-553.
- Umegaki K, Sugisawa A, Shin SJ, Yamada K, Sano M. Different onsets of oxidative damage to DNA and lipids in bone marrow and liver in rats given total body irradiation. Free Radic Biol Med 2001; 31 (9): 1066-74.
- Lee TJ, Kwon HC, Kim JS, Im SK, Choi KC. The Radiation Effect on Peripheral Blood Cell. J Korean Soc Ther Radiol 1988; 6 (2): 253-258.
- Koide K, Epperly MW, Franicola D, et al. Acetylated Resveratrol: A New Small Molecule Radioprotector. Paper presented at: Annual Meeting of American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO), 2008.
- Supplee H, Weinman EO, Entenman C. Enlargement of the Liver in Sprague-Dawley Rats Following Whole-Body X-Irradiation. Am J Physiol 1956; 185: 583-588.
- Lluch M, Ponz F. Immediate effects of x-irradiation on the intestinal absorption of glucose and radioprotection by cysteamine. Rev Esp Fisiol 1966; 22 (3): 109-14.
- Ord MG, Stocken LA, Biochemical Effects of Ionizing Radiation. Annual Review of Nuclear Science 1959; 9: 523-552.
- González-Gallego J, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ. Antiinflammatory properties of dietary flavonoids. Natr Hosp 2007; 22 (3): 287-93.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr Hosp 2002; XVII (6): 271-278.
- Dani C, Oliboni LS, Pasquali MAB et al. Intake of Purple Grape Juice as a Hepatoprotective Agent in Wistar Rats. J Med Food 2008; 11 (1): 127-132.
- Reagan-Shaw S, Mukhtar H, Ahmad N. Resveratrol Imparts Photoprotection of Normal Cells and Enhances the Efficacy of Radiation Therapy in Cancer Cells, Photochemistry and Photobiology. 2008; 84: 415-421.
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science 1997; 275: 218-220.
- Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS et al. Role of Resveratrol in Prevention and therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. Anticancer Res. 2004; 24 (5A): 2783-840.
- Silva J, Herrmann SM, Heuser V et al. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. Food Chem Toxicol. 2002; 40 (7): 941-7.
- Andrade EA, Fagundes WA, Machado MM et al. Projeto Tabagismo e Nutrigenética: efeito potencial radioprotector do suco de uva orgánico (Vitis vinifera): estudo preliminar ex vivo. 23° Jornada Académica Integrada, UFSM, 2008.

55

4.2 – EFEITOS DA INGESTÃO AD LIBITUM DE SUCO DE UVA NEGRA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE RATOS IRRADIADOS DE CORPO

INTEIRO

Artigo 2

AD LIBITUM BLACK GRAPE JUICE INGESTION EFFECTS ON OXIDATIVE STRESS IN LIVER FROM WHOLE BODY ACUTE RADIATION EXPOSURE IN

RATS

Edson Ramos de Andrade, João Batista Teixeira Rocha; Veronica Venturini R. Andrade,

Jacqueline C. Escobar Piccoli, Félix Alexandre Soares Antunes, Cristiane Lenz Dalla Corte,

Liliane de Freitas Bauermann, Paquita González, Juan Pablo Barrio, Javier González-Gallego,

Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

Manuscript ID: TRAB-2009-IJRB-0337

International Journal of Radiation Biology

ISSN 1362-3095 (electronic) 0955-3002 (paper)

56

Ad libitum black grape juice ingestion effects on oxidative stress in liver

from whole body acute radiation exposure in rats

Grape juice against liver harm in irradiated rats

Edson Ramos de Andrade¹, João Batista Teixeira Rocha¹; Veronica Venturini R.

Andrade¹, Jacqueline C. Escobar Piccoli¹, Félix Alexandre Antunes Soares¹, Cristiane

Lenz Dalla Corte¹, Liliane de Freitas Bauermann,² Paquita González³, Juan Pablo

Barrio³, Javier González-Gallego³, Ivana Beatrice Mânica da Cruz. 1,4

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e

Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria RS (Brazil).

²Departamento de Fisiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa

Maria, Santa Maria RS (Brazil).

³Institute of Biomedicine and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades

Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), University of León, León, Spain.

⁴Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade

Federal de Santa Maria, Santa Maria RS (Brazil).

Corresponding author: Edson Ramos de Andrade

e-mail: fisica.dna@gmail.com

57

Abstract

Purpose: The aim of this study was to evaluate the potential positive radiomodifier effect of

ad libitum black grape juice (Vitis labrusca) ingestion on the liver of rats against X-ray-

induced oxidative damage. Materials and Methods: Sixteen male Wistar rats were divided

into four groups where two were irradiated by X-rays from a 200 kV machine. Animals were

fed ad libitum and drank voluntarily 2-10 ml a day of black grape juice or placebo (isocaloric

glucose and fructose solution) for 6 days before and 15 days following 6 Gy X-irradiation

when they were sacrificed. Results: Primary antioxidant system changes were found in the

irradiated groups with positive effects due to black grape juice intake mainly over SOD, CAT

activities and GSH to GSSG ratio. Changes in protein expression were detected in PARP-1

and SOD for irradiated groups. No Histological alterations or DNA fragmentation was found.

Conclusions: Ad libitum black grape juice intake protects primary antioxidant system against

immediate and medium termed effects due to acute radiation exposure. This protection seems

to be extended to molecular level with positive action on protein expression and DNA

integrity.

Key Words: X-rays, Black grape juice, Radiomodifier, Liver, Rats

Introduction

Whole body exposure to ionizing radiation in humans and animals may trigger multiple organ dysfunctions directly related to an increase of cellular oxidative stress state. Such unbalance is caused by the overproduction of reactive oxidative species (ROS) including superoxide anion (O₂•), hydroxyl radical (*OH) and hydrogen peroxide (H₂O₂) (Mettler and Voelz, 2002, Coleman et al., 2003) from molecule ionization.

Acute effects of ionizing radiation exposure mainly include hematopoietic cell loss, immune suppression, mucosal damage, and potential injury to liver and other tissues. Whole organ irradiation might lead to hepatocyte failure and radiation-induced liver disease such as hepatitis (Khozouz et al., 2008).

Ionizing radiation exposure involves the development of potentially serious health conditions. Studies searching the safe radiomodifier compounds which have the ability to offer effective protection are relevant and would be required in the event of a massive radiological accident, a nuclear terrorist attack or a prolonged space travel (Wilson et al., 1999, Coleman et al., 2003, Saada et al., 2009, Saada et al., 2003).

Recent investigations suggested that compounds like polyphenols found in natural foods as grape and its products could be efficient as effective protectors against ionizing radiation overexposure. Castillo et al. (2000) showed a radioprotective effect of (*Vitis vinifera*) grape seed extract (GSE) in mouse bone marrow exposed to X-rays.

Polyphenols present in GSE showed protective effect against chromosomal damage from X-rays exposure. Enginar et al. (2007) evaluated GSE and vitamin E supplements on lipid peroxidation, on antioxidant system, and on peripheral blood lymphocytes in rats acutely whole body exposed to 6 Gy X-rays. In this study they found that GSE enhanced the antioxidant status and decreased the incidence of free radical induced lipid peroxidation in

blood. Furthermore, in the same study, they confirmed that the antioxidant effect of GSE was more effective when compared to that showed by vitamin E.

Similar results were described by Cetin et al. (2008). In that study, they used healthy male Wistar rats receiving GSE orally for seven days before and for four days after 8 Gy whole body irradiation. The authors found that the antioxidant parameters regarded to radiation-induced liver toxicity were restored to control values with GSE therapy. Additionally, Saad et al. (2009) using GSE in rats found radioprotective effects and a consequent decrease of toxicity due to acutely whole body exposure to ionizing radiation. They concluded that GSE treatment also attenuated the oxidative stress in pancreas, a fact that was associated with a significant improvement in radiation-induced hyperglycemia and hyperinsulinemia, suggestive of protection to the heart and pancreas from radiation-induced harmful effects.

A study conducted by Velioğlu-Oğun and co-workers (2009) concluded that the protection offered by grape products is probably related to its bioactive compounds as resveratrol. The authors found reversion on oxidative stress, DNA damage, and apoptosis rate in whole-body irradiated rats (8 Gy) under treatment with resveratrol from ten days before to ten days after irradiation.

However, all studies were directed towards the development of pharmacological compounds instead of nutraceuticals or functional foods. Therefore, the hypothesis that a moderate intake of black grape juice (BGJ) could also have a positive radiomodifier property is relevant and needs to be tested.

A previous study was performed by our team (Andrade et al., 2009a, Andrade et al., 2009b) using male Wistar rats under acute whole body exposure to 6 Gy X-rays. In this study, rats were treated with BGJ before and after radiation exposure. This study showed that *ad libitum* BGJ intake seems to offer a positive radiomodifier effect over selected hematological

parameters and organs. Furthermore, rats treated with BGJ showed a decrease on immediate acute radiation syndrome symptoms, remarkably in the maintenance of the liver weight for BGJ treated group in comparison to control, which presented a decrease of 25% of liver weight (Andrade et al., 2009a,b).

We postulated that this result could be related to differential oxidative stress modulation in cellular and liver tissue of rats supplemented with BGJ and tested this hypothesis in the present study.

Materials and Methods

Animals, irradiation and food

Sixteen male Wistar rats weighing 200–250g (Harlan, Barcelona, Spain), housed at the animal house of University of León (Spain) were included in the study. The experimental protocol used was approved by the University of León Ethical Committee, and adhered to the European Community Guiding Principles for the Care and Use of Animals. Four groups were defined as: (NI-GJ) non-irradiated grape juice supplemented; (NI-GL) non-irradiated, placebo (isocaloric glucose plus fructose) supplemented; (I-GJ) irradiated, grape juice supplemented; and (I-GL) irradiated, placebo (isocaloric glucose/fructose solution) supplemented. In order to immobilize the animals, anesthesia was induced by intraperitoneal administration of pentobarbital 0.6% in saline (10 ml/kg body weight), at noon, 15 minutes before irradiation, ensuring the loss of palpebral and plantar reflex activity and spontaneous respiration throughout the procedure. The animals were placed in decubitus pronus on a plexiglas board. Four animals were irradiated at a time and exposed to a single dose of 6 Gy of whole-body Xirradiation (TBI) from an X-ray machine (200 kV) MAXISHOT 200 (YXLON, Copenhagen, Denmark), at a radiation dose rate of 0.40 Gy/min, with a source-skin distance (SSD) of 50 cm. Animals were fed according to a standard rat chow diet, having free access to ad libitum water and food. After one week adaptation to individual cages, they were allowed to ingest a maximum of 10 ml of test compound (grape juice) or placebo, depending on their assigned group. Environmental conditions were controlled (12-hour photoperiod and 20 ± 2 °C) throughout the experimental period. The design of the experiment, pointing out the 15th day after irradiation, was based on the previous work by Park et al (Park, 1993) showing 14 days

as the time they had the most pronounced radioprotective effect from phytotherapics at liver site in mice.

Grape Juice Fruit Characteristics

Ecologically-produced (organic) BGJ was obtained from grapes cultivated in 2007, and the juice was prepared the same year. The concentration (mg/L) of the main phenolic compounds in the grape juice was determined as follows: Resveratrol 3.95 \pm 0.01, Quercetin 8.95 \pm 0.09 and Rutin 3.75 \pm 0.03. Placebo solution was made using an equimolar mixture of glucose and fructose to be isocaloric with the sugar composition in the grape juice (95 g/L).

Liver tissue biochemical oxidative biomarkers

The amount of aldehydic products generated by lipid peroxidation was quantified by measuring the concentration of thiobarbituric acid–reactive substances (TBARS) (Wills, 1987). The homogenate was diluted at 1:800 in all analyses. One gram of liver in 9 mL of potassium phosphate 0.1 M, pH 7.4 was homogenated using a Polytron mixer (Kinematica AG, Switzerland). After heating at 90 °C for reacting with thiobarbituric acid, tubes were cooled and centrifuged at 2000×g. The organic layer (supernatant) was collected and the absorbance was read at 532 nm using a spectrophotometer.

Cu/Zn (SOD-1) referred as SOD and mitochondrial SOD referred as SODmit, activity measurements were performed as described by (Misra and Fridovich, 1972). This method is based on the inhibition of adenochrome formation in the self-oxidation of epinephrine. Measurements were performed at 480 nm, rate 0.025 nm/min, and 30 °C. A bicarbonate buffer EDTA pH=10.2 and epinephrine 4 mM (PM=183.21) were used.

Catalase (CAT) activity was determined based on the consumption of hidrogen peroxide by the sample, using a spectrophotometer at 240 nm within 2 min at 25 °C reading each 5 seconds. A 50 mM (pH=7.0) sodium phosphate buffer and hydrogen peroxide at 0.3 M were used.

Oxidized glutathione (GSSG) and reduced glutathione (GSH) analyses were performed fluorimetrically. Briefly, 250 mg of tissue was homogenized in 0.1 M sodium phosphate 5 mM EDTA buffer (pH 8.0) with 25% phosphoric acid at a proportion of 1:20. The mixture was centrifuged at 100,000×g for 30 min at 4 °C, the supernatant was collected, and 500 µL was diluted with 4.5 mL of buffer. Two spectrophotometry cuvettes per sample were prepared with 1.8 mL of phosphate-EDTA buffer, 100 µL of supernatant and 100 µL of Ophthalaldehyde. After incubating for 15 min at 4 °C, a spectrofluorometric reading was obtained at an excitation wavelength of 350 nm and an emission wavelength of 420 nm. To find the percentage of glutathione corresponding to oxidized and reduced forms, 500 µL of the sample supernatant was incubated with 20 µL of 4-vinylpyridine for 30 min; to this mixture 4.5 mL of 0.1 N NaOH was added. A 100 µL portion of this mixture was then processed as described above to determine GSSG. GSH was obtained by subtracting GSSG from total glutathione.

GPx activity was measured by the method described by Paglia and Valentine (1967). Briefly, the reaction mixture contained 0.2 mL of 0.4 M phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 mL of 10 mM sodium azide, 0.2 mL of tissue homogenate (supernatant; homogenized in 0.4 M phosphate buffer, pH 7.0), 0.2 mL of GSH, and 0.1 mL of 0.2 mM hydrogen peroxide. The contents were incubated at 37 °C for 10 min. The reaction was stopped by adding 0.4 mL of 10% TCA and centrifuged. Spectrophotometric determination of GPx activity (μmol/min·mg prot) was started by addition of 5 μl of NADPH, and NADPH oxidation of was followed each

30 s for 4 min at 340 nm. Nonenzymatic NADPH oxidation was subtracted from the overall rate.

Tissue was always homogenized using a glass Teflon Potter-Elvehjem homogenizer (B. Braun, Melsungen, Germany). The entire procedure was performed using a Beckman centrifuge (model J2-21 M/E; Beckman Instruments, Palo Alto, CA).

Western blot analysis

In order to perform Western blot analysis of Cu/Zn SOD (SOD), poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1), and p53, liver tissue was homogenized in 10 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 100 mM NaCl and protease and phosphatase inhibitor cocktails (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and centrifuged at 13,000×g for 30 min. Protein concentration of the cytosolic and nuclear liver fractions was measured by the Bradford assay. Equal amounts of protein (40 µg) were separated by 10–12% sodium dodecyl sulphatepolyacrylamide gel electrophoresis and transferred electrically to polyvinyllidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). The membranes were then blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST) for 30 min at 37 °C and probed overnight at 4 °C with polyclonal anti-SOD, anti-PARP-1 and anti-p53 (1:1200 Santa Cruz Biotechnology, Rabbit polyclonal). Equal loading of protein was demonstrated by probing the membranes with a rabbit anti-b-actin polyclonal antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA; 1:1000). After washing with TBST, the membranes were incubated for 1 h at room temperature in TBST containing secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark; 1:4000). Membranes were briefly incubated with ECL detection reagent (ECL; Amersham, Buckinghamshire, UK) to visualize the proteins and then were exposed in a cassette for 5 min to an X-ray film (Hyperfilm ECL; Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). The film was

then developed in 16% Ilford Phenisol developer solution and fixed in 16% Ilford Hypam rapid fixer solution (Ilford Imaging UK Ltd., Cheshire, England, UK). Membranes were scanned with a CCD camera and quantified using a Scion Image Software (version 4.0.3.2, Scion Corporation, Frederick, MD, USA). Protein expression rates were normalized through the corresponding expression rates of b-actin.

DNA fragmentation

To detect DNA laddering, the liver tissue was suspended in lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 20 mM EDTA, and 1%N-lauroylsarcosine sodium, and incubated with 100 μg/mL proteinase K at 37 °C overnight. Then, equal volumes of phenol/chloroform isoamylalcohol (CIAA) were added to the sample solution, mixed, and centrifuged at 13,000×g for 5 min. The resulting supernatants were incubated with 100 μg/mL RNase at 37 °C for 1 h. Phenol/CIAA was added to the sample solutions and centrifuged at 13,000×g for 5 min. The resulting supernatants were treated with CIAA and then centrifuged again at 13,000×g for 5 min. DNA in the solution was precipitated with ethanol at -20 °C, dissolved in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 1 mM EDTA and then subjected to electrophoresis for 30 min at 100 V using a 3% agarose gel ME (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) containing 40 mM Tris-acetate, pH 7.8, 2 mM EDTA and 0.5 μg/ml ethidium bromide. After electrophoresis, the gels were photographed under ultraviolet light by Bio-Rad Gel Documentation System and quantified by Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA). The relative levels of apoptotic DNA ladders per sample were estimated by side-by-side, semi quantitative analysis of the images by one viewer.

Histological analysis

Histological analysis of liver tissue was performed to verify possible morphological changes that could indicate possible remain damages due to exposure to radiation. Liver tissues were fixed with 10% buffered formalin, embedded with paraffin, and then hematoxylin-eosin (HE) staining dyeing was performed. Liver fibrosis was evaluated by a semi-quantitative method to assess the degree of histological injury using the following criteria: grade 0: normal liver; grade 1: few collagen fibrils extended from the central vein to the portal tract; grade 2: apparent collagen fibril extension without encompassing the whole lobule; grade 3: collagen fibrils extended into and encompassed the whole lobule; grade 4: diffuse extension of collagen fibrils and formation of pseudo-lobule. Fat globules presence and necroinflammation were also investigated in the liver tissue comparison among treatments.

Statistical analysis

Means and S.D. were calculated for all data. Significant differences between means were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and in the case of significance the Duncan test was also applied. A difference was considered significant when p was less than 0.05. Calculations were performed with SPSS 13.0 statistical software (Chicago, IL, USA).

Results

BGJ and glucose solution as well as water consumption were initially analyzed in the period before and after ionizing radiation exposure. Daily glucose solution (9.89 \pm 0.86 mL/day) intake was higher when compared to BGJ supplementation (6.42 \pm 0.86 mL/day) within six days before radiation exposure (p=0.025).

Results from BGJ and glucose solution intake after irradiation appear in Table I. Rats submitted to NI-GJ treatment showed lower daily BGJ consumption (mL/day) when compared to all other treatments before exposure. However, irradiated rats from I-GJ group presented risen BGJ consumption in comparison to NI-GJ group. This behavior was not shown by the group treated with isocaloric glucose solution which consumed the same amount of glucose solution.

The daily water consumption was higher in NI-GL (control group) when compared to irradiated rats receiving water or grape juice and no-irradiated rats that received grape juice (Table I). Additionally, we analyzed the total liquid consumption (juice or glucose solution plus water) and no significant differences were found among groups.

Table I here

After a 15-day treatment a differential liver oxidative response was observed among rats receiving or not dietary BGJ *ad libitum* supplementation and submitted or not to ionizing radiation, as can be seen in Table II.

Table II here

Additionally, the mean daily flavonoid intake was estimated for BGJ supplemented groups (NI-GJ and I-GJ) without significant differences between rats submitted or not to irradiation (Figure 1).

Figure 1 Here

Oxidative biomarkers were initially compared between rats supplemented with glucose solution and BGJ without irradiation treatment in order to evaluate possible differences (Table II). We observed that non-irradiated treatment groups (NI-GL and NI-GJ) showed similar mean values in all oxidative biomarkers evaluated except GPX activity which was higher in NI-GL when compared to NI-GJ group.

CAT and SODmit activities were similar in all four treatments. A significant increase of lipid peroxidation evaluated by TBARS and expressed as MDA was observed in exposed rats (I-GL) when compared to control rats (NI-GL). Also, a decrease in SOD, GPX, GSH and GSSG activity/levels was found in I-GL group when compared to NI-GL.

BGJ supplementation showed a reverse effect on lipid peroxidation, SOD, GPX and GSH in rats exposed to ionizing radiation (I-GJ) since the mean values of these oxidative biomarkers were similar to those observed in control group (NI-GL) and showed differences when compared to irradiated group (I-GL) (Figure 2). Additionally, we observed that I-GJ group showed the highest GSH/GSSG ratio compared with the rest of groups (NI-GL, I-GL and NI-GJ).

The possible effect of BGJ supplementation on cellular expression related to DNA

repair and inflammatory process as the poly(ADP-ribose) polymerase enzyme (PARP-1) and

cellular control mitosis (p53 protein) was also investigated. Additionally, we analyzed the

liver Cu/Zn SOD protein expression since we observed significant differences in the enzyme

activity related to different treatments. We did not find significant differences in p53 protein

expression and liver tissue histological parameters. Significant differences were found in

PARP-1 which was risen in BGJ supplemented groups in comparison with glucose ones. A

decrease in Cu/Zn SOD protein expression was found in irradiated control group (I-GL) when

compared to other groups including I-GJ treatment (Figure 3).

Figure 3 here

Radiation-induced genotoxicity impact was evaluated by analysis of DNA

fragmentation (Figure 4). There were no tracks of DNA laddering among groups.

Additionally, we did not find significant differences in histological analysis (figure 5)

considering fat globules presence, inflammation occurrence as signalled by hepatocellular

alteration patterns, and fibrosis appearance.

Figure 4 here

Figure 5 here

Discussion

The search for protective agents for use in a variety of radiation scenarios has continued for more than six decades. Over the years, extensive experimental studies of radiation-protective agents have enhanced our knowledge of radiation physics, chemistry, and biology. However, translation of agents from animal testing to use in various scenarios, such as prophylactic adjuncts in radiotherapy or post-exposure treatments for potential victims of radiation accidents/incidents and even in military operations has been slow (Weiss and Landauer, 2009). Possible associated limitations could be related to experimental designs which potentially are not comparable between humans and animal models for all purposes. Generally, in experimental models evaluations of radioprotective molecules are performed in highly controlled conditions swallowed in order to avoid too much variation in the responses obtained.

Based on recent and previous investigations that showed radioprotective effect of resveratrol and extracts from grape seed in rats (Carsten et al., 2008, Saada et al., 2009) under controlled conditions (the compounds were administered by gavage) we tested if the *ad libitum* BGJ ingestion has some radioprotective action in irradiated rats. In these experimental conditions we observed that the BGJ *ad libitum* ingestion exerts some protection against oxidative stress caused by ionizing irradiation. However, it is important to discuss some methodological issues.

First of all, it is important to point out that results found here were checked 15 days after exposure to radiation. This immediate- to medium-termed study pictures a redox state after several recovering reactions.

The radiation-induced harm has started from a macroscopic view at dietary pattern.

Glucose supplemented animals (NI-GL and I-GL) used to drink increased quantities of

glucose solution when compared to animals supplemented with grape juice (NI-GJ and I-GJ). However, when we compared the total liquid ingestion, all groups presented similar values. Probably, this dietary pattern would be explained by the nature of post-ingestive satiety for sugar solutions (Mook and Brandsey, 1982). The total liquid intake over all experiment time intervals was the same for all groups. Therefore, for this experimental set up we did not find influence of radiation exposure on total the ingestion pattern.

Before sacrifice, one animal from each group was randomly picked up in order to check blood glucose levels, and all presented normal levels. The total sugar intake was the same for all groups. This fact strongly contributes for eliminating possible variables regarded to energetic unbalances. Therefore, further effects over the liver could be attributed mainly to flavonoid content presented in BGJ.

The oxidative status in liver was evaluated, since the liver tolerance to radiation exposure is controversial, and in a previous study an effect of BGJ ingestion on liver growth was found (Andrade et al., 2009b). Here, we observed that lipid peroxidation was higher in irradiated rats without BGJ supplementation when compared to irradiated controls. The risen MDA estimation in I-GL group coupled to I-GJ group at control level is suggestive of intrinsically protection offered by BGJ *ad libitum* intake against lipid peroxidation in liver. Our results corroborate previous studies which investigated the radioprotective role of GSE administered by gavage. Cetin and colleagues (2008) found that GSE protected the hepatocellular membrane from oxidative damage and consequently from protein and lipid oxidation in irradiated rats. Studies reporting GSE effects against ionizing radiation exposure focusing on other organs were also found. Saada and co-workers (2009) observed that GSE gavage administration 14 days before irradiation attenuated the oxidative-stress in heart and pancreas tissues. Investigation performed by Enginar et al. (2007) evaluated the potential positive radiomodifier effect of GSE and vitamin E supplements on blood lymphocytes. They

found that GSE enhanced the antioxidant status and fell free-radical induced lipid peroxidation in blood samples of rats exposed to X-radiation. Therefore, considering the influence of grape products on lipid peroxidation, our results suggest that oral *ad libitum* BGJ ingestion has some protective function as observed in controlled dose investigations.

The liver primary antioxidant system (SOD, CAT and GPx) as a whole was greatly affected by X-irradiation. Considerable reduction in SOD activity was found in I-GL group, suggestive of failure on managing unbalances from superoxide (O_2^{\bullet}) production which represents the first wave of free radical generation. The hydroxyl radical (${}^{\bullet}$ OH) overproduction, a second wave, might come up from these unbalances with possible serious implication to the liver functionality. The irradiated BGJ supplemented group (I-GJ) activity was found at control levels, which is indicative of primary antioxidant system recovering or strong scavenger activity offered by its flavonoid content. SOD expression, as measured by western blotting, was found significantly increased in I-GJ group when compared to I-GL and control NI-GL (figure 3A). The increase in SOD expression is possibly an effect of BGJ improving the first barrier on the primary antioxidant system. Similar results were described by Cetin et al. (2008) whom found that superoxide dismutase activities decreased in liver homogenates following irradiation and these alterations were significantly reversed by GSE treatment.

CAT and SODmit activities were found at control levels for all groups. This result is meaningful and allows inferring two important points: (a) unchanged CAT suggests that the problem is at the superoxide phase of oxidative stress, indicating that BGJ seems to be capable of acting at the first wave (superoxide phase) of free radical production in liver, and (b) SODmit at control levels is suggestive that harm is at citoplasmatic level. Although our results are in accordance with Cetin et al. (2008), who reported that radiation exposure decreases CAT levels, complementary studies need to be performed to confirm this result.

A decrease in GPx activity in non supplemented irradiated group (I-GL) can be indicative of reduced action of non-enzymatic antioxidant system (e.g. GSH). Glutathione peroxidase can also metabolize lipid hydroperoxides to relatively non-reactive fatty acids. Thus, a decrease in GPx activity can be linked to an increase on lipid peroxidation. The GPx activity in the BGJ supplemented group (I-GJ) presented no alteration when compared with control (NI-GL), suggesting a protective action of BGJ over the primary antioxidant system.

Additionally, a decrease in the non-enzymatic system is found by GSH for irradiated non-supplemented I-GL group. On the other hand, the BGJ supplemented group intracellular GSH was found at control edge. As GSH plays an important role in catalyzing H₂O₂, this result is in agreement to that found for CAT, thus supporting the idea related to timescale of BGJ protective action.

The amount of GSSG became lower in I-GL group as well. A decrease in GSSG is possibly linked to GSH and GPx reduction in I-GL. The redox index GSH/GSSG ratio was found at control levels for I-GL, possibly due to the decrease for both GSH and GSSG, simultaneously. On the other hand, the group supplemented with BGJ showed an increase in GSH/GSSG ratio, due to its lower amount of GSSG in I-GJ group. The BGJ seems to increase the amount of intracellular GSH in the liver, which becomes available to serve as GPx cofactor raising the free radical scavenging.

In order to investigate the extension of radiation-induced damage taken by liver tissue, p53 and PARP-1 were evaluated as cell death markers. Unfortunately, we did not find similar studies investigating the effect of grape products in p53 and PARP-1 biomarkers. As can be seen in Figure 3B, regarding PARP-1, I-GJ showed differences from I-GL and NI-GL, suggestive of a possible pro-apoptotic trend, even though the p53 protein expression in liver was the same for all groups (Figure 3C). Furthermore, we observed no histological changes or differences in DNA damage among treatments. These results might indicate that in the early

phase of acute whole body radiation exposure investigated here there is no detectable apoptotic activity, histological modifications or DNA damage. However, complementary studies to evaluate the chronic radioprotectiveness of *ad libitum* BGJ ingestion need to be performed in order to observe the BGJ potential positive radiomodifying action on these biological parameters.

Conclusions

We found a positive radiomodifying effect of *ad libitum* BGJ intake on liver under acute whole body ionizing radiation exposure in rats. The decrease in liver lipid peroxidation and the increase in SOD and GPX antioxidant enzyme activity in BGJ supplemented rats, indicate a positive radiomodifier effect due to black grape juice supplementation. These results bring a set of possibilities of using an antioxidant food as preventive tool against radiation-induced harm. However, additional and complementary studies need to be performed to confirm these data.

References

- Andrade, E. R., Piccoli, C. E., J. Manica Da Cruz, I. B. Teixeira Rocha, J. B. Garzo, E. Marina, R. Mauriz, J. L. Gonzalez, P. Barrio, J. P. & Al., E. (2009a) Radiomodifying effect of organic grape juice supplementation on hematological parameters and organ weight in whole-body X-irradiation in rats. *Nutr Hosp*, 24, 297-303.
- Andrade, E. R., Piccoli, J. C., Cruz, I. B., Rocha, J. B., Andrade, V. V., González, P., Bauermann, L. F., Barrio, J. P. & Et.Al (2009b) Effect Of Black Grape Juice Intake On Liver Lipoperoxidation And Body Weight Loss In Whole Body X-Irradiated Rats. *J Med CBR Def*, 7, 1-12.
- Carsten, R. E., Bachand, A. M., Bailey, S. M. & Ullrich, R. L. (2008) Resveratrol reduces radiation-induced chromosome aberration frequencies in mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 169, 633-8.
- Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Lorente, J., Alcaraz, M., Redondo, A., Ortuno, A. & Del Rio, J. A. (2000) Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (Vitis vinifera): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J Agric Food Chem*, 48, 1738-45.
- Cetin, A., Kaynar, L., Kocyigit, I., Hacioglu, S. K., Saraymen, R., Ozturk, A., Orhan, O. & Sagdic, O. (2008) The effect of grape seed extract on radiation-induced oxidative stress in the rat liver. *Turk J Gastroenterol*, 19, 92-8.
- Coleman, C. N., Blakely, W. F., Fike, J. R., Macvittie, T. J., Metting, N. F., Mitchell, J. B., Moulder, J. E., Preston, R. J., Seed, T. M., Stone, H. B., Tofilon, P. J. & Wong, R. S. (2003) Molecular and cellular biology of moderate-dose (1-10 Gy) radiation and potential mechanisms of radiation protection: report of a workshop at Bethesda, Maryland, December 17-18, 2001. *Radiat Res*, 159, 812-34.
- Enginar, H., Cemek, M., Karaca, T. & Unak, P. (2007) Effect of grape seed extract on lipid peroxidation, antioxidant activity and peripheral blood lymphocytes in rats exposed to x-radiation. *Phytother Res*, 21, 1029-35.
- Khozouz, R. F., Huq, S. Z. & Perry, M. C. (2008) Radiation-induced liver disease. *J Clin Oncol*, 26, 4844-5.
- Mettler, F. A., Jr. & Voelz, G. L. (2002) Major radiation exposure--what to expect and how to respond. *N Engl J Med*, 346, 1554-61.
- Misra, H. P. & Fridovich, I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 247, 3170-5.
- Mook, D. G. & Brandsey, S. A. (1982) Preference--aversion drinking in the rat: the nature of postingestive satiety for sugar solutions. *Appetite*, 3, 297-307.
- Paglia, D. E. & Valentine, W. N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70, 158-69.
- Park, Y. S. (1993) Radioprotective Effects of Red Ginseng Extracts on Antioxidants and Lipid Peroxidation in Liver in gamma-Irradiated Mice. *Korean Journal of Biochemistry*, 26, 184-191.
- Saada, H. N., Said, U. Z., Meky, N. H. & Abd El Azime, A. S. (2009) Grape seed extract Vitis vinifera protects against radiation-induced oxidative damage and metabolic disorders in rats. *Phytother Res*, 23, 434-8.
- Saada, H. N., Ussama, Z. S. & Mahdy, A. M. (2003) Effectiveness of Aloe vera on the antioxidant status of different tissues in irradiated rats. *Pharmazie*, 58, 929-31.
- Velioglu-Ogunc, A., Sehirli, O., Toklu, H. Z., Ozyurt, H., Mayadagli, A., Eksioglu-Demiralp, E., Erzik, C., Cetinel, S., Yegen, B. C. & Sener, G. (2009) Resveratrol protects against

- irradiation-induced hepatic and ileal damage via its anti-oxidative activity. *Free Radic Res*, 1-12.
- Weiss, J. F. & Landauer, M. R. (2009) History and development of radiation-protective agents. *Int J Radiat Biol*, 85, 539-73.
- Wills, E. (1987) Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. *Biochemical toxicology, a practical approach*, 127-152.
- Wilson, J. W., Cucinotta, F. A., Shinn, J. L., Simonsen, L. C., Dubey, R. R., Jordan, W. R., Jones, T. D., Chang, C. K. & Kim, M. Y. (1999) Shielding from solar particle event exposures in deep space. *Radiat Res*, 30, 361-82.

Table I. Mean±SE values comparison of grape fruit juice (GJ), glucose (GL), water and proportion of GJ/GL by total of liquid ingested in rats exposed or not to ionizing radiation.

		M. LOD	95% Confide			
	Groups	Mean±SE	Lower Bound	Upper Bound	p	
Grape Juice or Glucose (mL/day)	NI-GL	9.45±1.19 ^a	2.99	7.13		
	I-GL	9.32±1.03 ^a	4.57	9.11	0.032	
	NI-GJ	4.87±1.03 ^b	7.05	11.58	0.032	
	I-GJ	6.85±1.03 ^a	6.83	12.07		
Water (mL/day)	NI-GL	34.46±4.17 ^a	25.15	43.77		
	I-GL	25.64±2.95 ^b	19.05	32.22	0.050	
	NI-GJ	29.20±2.95 ^b	22.61	35.78	0.030	
	I-GJ	24.04±2.95 ^b	15.46.	28.62		
(%)	NI-GL	23.42±5.50 ^a	10.97	35.87		
GJ or GL/total liquid ingestion (%)	I-GL	27.76±3.89 ^a	18.96	36.56	0.329	
	NI-GJ	16.09±4.49 ^a	5.93	26.26	0.327	
	I-GJ	24.24±3.89 ^a	15.44	33.05		

(NI-GJ) non-irradiated grape juice supplemented; (NI-GL) non-irradiated, placebo supplemented; (I-GJ) irradiated, grape juice supplemented, and (I-GL) irradiated, placebo supplemented. Values are expressed as means of four records \pm SD. Means with different superscript letters are significantly different at p < 0.05 by General Linear Model repeated measures followed Duncan *post hoc* test. SE=standard error.

Table II – Comparison oxidative metabolism parameters in fresh liver tissue in rats with grape juice fruit supplementation and ionizing radiation exposure and respective controls.

Variables	Treatments				
Vallables	NI-GL	I-GL	NI-GJ	I-GJ	. <i>p</i>
MDA (µmol/mg prot)	0.87±0.21ac	1.38±0.18 ^b	0.73±0.11a	1.00±0.20°	0.001
SOD (U/mg prot)	491.64±35.72ª	358.61±37.05 ^b	544.48±84.2ª	535.17±120.03a	0.038
SODmit (U/mg prot)	11.26±1.52°	10.95±2.18ª	10.57±2.34°	10.59±2.29a	0.947
CAT (pmol H ₂ O ₂ /mg prot)	5.886 ± 0.569^{ab}	6.530±0.314 ^b	6.486 ± 0.64^{b}	5.730±0.244 ^b	0.045
GPx (μmol NADPH/min mg prot)	0.130 ± 0.01^{a}	0.089 ± 0.03^{b}	0.075±0.01b	0.104 ± 0.04^{ab}	0.044
GSH (µmol GSH/mg prot)	1.57 ± 0.25^{a}	1.24±0.07 ^b	1.62±0.15a	1.62 ± 0.05^{a}	0.007
GSSG (µmol GSSG/mg prot)	0.0024 ± 0.002^a	0.0016 ± 0.006^{b}	0.0017 ± 0.007^{ab}	0.0012 ± 0.004^{b}	0.030
GSH/GSSG	722.45±137 ^a	750.19±185a	1234.88±362ab	1693.00±604 ^b	0.015

(NI-GJ) non-irradiated grape juice supplemented; (NI-GL) non-irradiated, placebo supplemented; (I-GJ) irradiated, grape juice supplemented, and (I-GL) irradiated, placebo supplemented. Values are expressed as means of four records \pm SD. Means with different superscripts letters are significantly different at p < 0.05 by Anova-One Way test followed Duncan post hoc test.

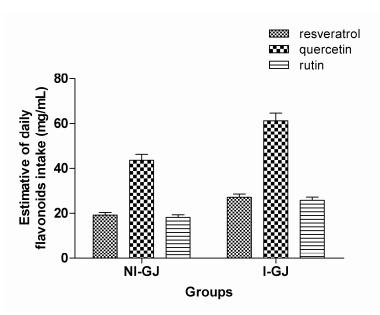


Figure 1 – Estimation of flavonoid mean intake of rats under grape juice consumption during total study period. NI-GJ= non-irradiated grape juice; I-GJ= irradiated, grape juice.

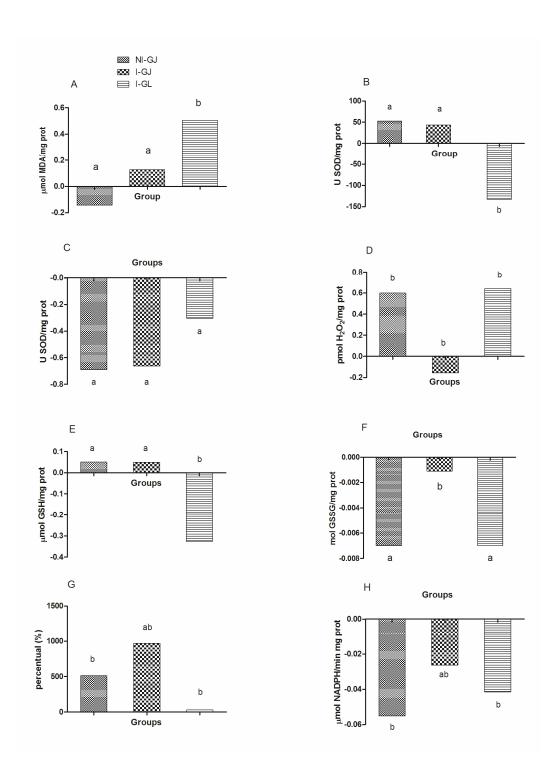


Figure 2– Mean differences of liver tissue selected parameters under investigation means differences of each group related to non-irradiated rats supplemented with glucose solution (NI-GL), which was considered the control group. (A) MDA, (B) Cu/ZnSOD, (C) MnSOD, (D) CAT, (E) GSH, (F) GSH/GSSG ratio, (G) GPx and (H) GSSG. In each variable, different letters indicate statistical differences in relation to NI-GL group.

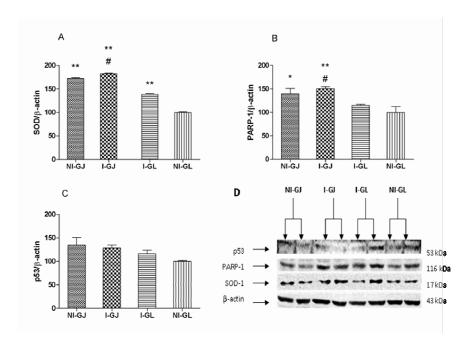


Figure 3 – Liver tissue selected parameters under investigation. (A) superoxide dismutase (SOD-1) activity, (B) SOD-1 protein expression, (C) poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) protein expression and (D) p53 expression. Protein expression measurements were performed following western blot technique. SOD-1 biochemical activity analysis was performed as reported by Misra and Fridovich (1972). Groups were organized as follow: (NI-GJ) non-irradiated grape juice; (NI-GL) non-irradiated, placebo; (I-GJ) irradiated, grape juice, and (I-GL) irradiated, placebo. (*) and (**) indicate statistical differences (p < 0.05) and (p < 0.01) respectively when compared to NI-GL group. (#) indicates statistical differences (p < 0.05) when compared to NI-GJ group.

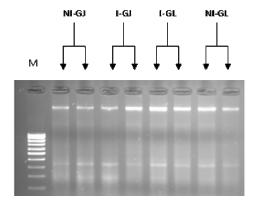


Figure 4 – Liver tissue DNA fragmentation test for all groups compared to marker M. Groups were organized as follows: (NI-GJ) non-irradiated grape juice; (NI-GL) non-irradiated, placebo; (I-GJ) irradiated, grape juice, and (I-GL) irradiated, placebo.

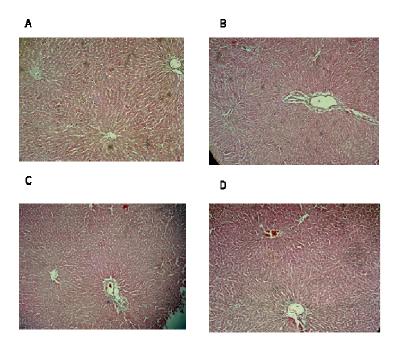


Figure 5 – Representative histological slices of liver tissue. Groups were organized as follows: (A = NI-GJ) non-irradiated grape juice; (B = I-GJ) irradiated grape juice, (C = I-GL) irradiated, placebo, and (D = NI-GL) non-irradiated placebo. Magnification 10x.

5 DISCUSSÃO

A exposição de mamíferos de forma aguda de corpo inteiro à radiação ionizante causa ou potencializa um estado fisiopatológico degenerado e complexo. Inicialmente esta exposição pode levar ao aparecimento de um conjunto de sintomas denominado Síndrome Aguda da Radiação (SAR). Entretanto, a maior parte dos dados epidemiológicos existentes é resultado de observações provenientes de grandes catástrofes como guerras e acidentes radiológicos e/ou nucleares, o que naturalmente implica em grande variabilidade nas medidas. Como em caso de acidentes existe a necessidade de resgate da população afetada, indivíduos envolvidos nesta ação também podem ser afetados. O paradigma associado a proteção destes indivíduos envolve a chamada "blindagem física" em que três aspectos são considerados: uso de material que bloqueie a penetração da radiação ionizante, permanecimento da maior distância da fonte de radiação e no menor tempo possível (Browne et al 1992). Entretanto, novos aspectos relacionados a proteção à radiação começaram a ser investigados emergindo assim o conceito de "blindagem biológica". Isto é, o uso de compostos radiomodificacores positivos que diminuam os efeitos tóxicos da radiação.

Porém, não é fácil identificar e determinar os efeitos diretos de compostos radioprotetores no ser humano. Isto porque existe a necessidade de desenvolvimento de ensaios clínicos controlados de fase II e III que não são eticamente possíveis já que representam um grande risco de morbidade e mortalidade para os voluntários da pesquisa. Esta situação aumenta a relevância das investigações em modelos experimentais ao mesmo tempo que diminui a possibilidade de desenvolvimento de substâncias farmacológicas artificiais para utilização em individuos que serão expostos em caso de acidentes de trabalho (por exemplo, em locais onde existem reatores nucleares, como foi o caso do acidente em Chernobil), inadivertidamente causados (como foi o caso do acidente com o ¹³⁷Césio em Goiânia) ou guerra e terrorismo.

Por tal motivo há grande interesse em investigações relacionadas a compostos que podem levar a uma "blindagem biológica" e que devem também ser realizadas com "alimentos candidatos a radiomodificadores positivos". Este é o caso da uva e seus produtos onde estudos anteriores em condições altamente controladas de ingestão por gavage de extrato de sementes do suco de uva por ratos (Enginar et al., 2007, Saad et al., 2008). Porém, este delineamento amplamente utilizado em pesquisas com modelos animais demanda um viés

experimental no caso de experimentos que envolvem análise dos efeitos em curto prazo da exposição à radiação ionizante, já que tais efeitos necessariamente passam por alterações gastrointestinais importantes que levam a estados anoréticos e perda de peso. Por este motivo, a investigação do efeito radiomodificador positivo de alimentos ou suplementos alimentares precisam, preferencialmente ser "não-controlados" em relação à quantidade e a busca do alimento.

Dentro desta perspectiva é que foi delineado o presente estudo. O conjunto dos resultados do trabalho sugere a ocorrência de efeitos radiomodificadores positivos proveniente da ingestão oral *ad libitum* do suco de uva orgânica (*Vitis labrusca*, Bordô) em indicadores morfológicos, fisiológicos e bioquímicos da SAR em ratos machos Wistar.

A seguir serão discutidos em mais detalhe os resultados obtidos, bem como outras considerações pertinentes ao estudo incluindo as suas possíveis limitações. Para tanto, os resultados serão discutidos considerando-se as alterações potenciais relacionadas com a SAR que foram aqui investigadas e o efeito da suplementação com suco de uva sobre elas: (1) alteração de peso corporal associado às modificações metabólicas e comportamento alimentar; (2) alterações hematológicas; (3) alterações hepato-oxidativas e hepato-metabólicas.

O complexo cenário radiobiológico discutido na tese pode ser resumido e a figura 12 apresenta as principais etapas do trabalho de tese.

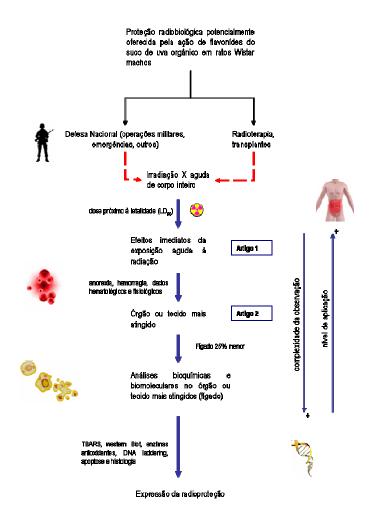


Figura 12 – Visão geral do trabalho de tese

5.1 Alterações no peso corporal

A SAR inclui um intenso quadro anorético que se instala e esta condição pode ser observada através da variação do peso corporal e do comportamento de ingestão alimentar dos animais. Estas duas variáveis foram analisadas e os principais resultados apresentados no **Artigo 1**. Como era esperado, a exposição à radiação levou a uma diminuição substancial tanto no peso corporal ao longo do período em que os ratos foram obervados quanto no peso de diversos órgãos após 15 dias da irradiação. Porém, este quadro mostrou que tal efeito foi suprimido nos animais irradiados do grupo tratado com suco de uva quando comparado aos ratos irradiados não suplementados considerando o peso corporal total. Como o suco de uva

possui um percentual de carboidrato que aumenta a quantidade calórica ingerida pelo animal, este poderia ser um fator interveniente importante. Por este motivo, a dieta dos ratos não tratados foi suplementada com solução de glicose e frutose a fim de corrigir o aumento calórico associado à suplementação com o suco de uva. Assim, foram realizados testes prévios para averiguar a aceitabilidade na ingestão do suco e da solução de glicose que mostrou similaridade.

Uma das possíveis causas que poderia levar às diferenças observadas no peso corporal também poderia incluir diferenças no consumo médio de água e de ingestão sólida pelos animais (tratados e não tratados). Entretanto, o consumo médio de água foi o mesmo e não foi detectado diabetes em nenhum dos grupos, afastando variabilidades devidas a possíveis desbalanços energéticos.

Também deve ser comentada a natureza voluntária da ingestão do suco de uva orgânico pelos animais. Como descrito nos resultados do **Artigo 1**, houve uma grande variabilidade individual, mas todos os animais dos grupos MR e MN beberam pelo menos 2 mL de uma máxima quantidade permitida de 10 mL. A solução placebo, ao contrário, parece ser mais palatável, com um mínimo de 8 em cada 10 mL sendo bebida diariamente. A escolha do limite máximo de consumo de suplemento com suco foi realizada com base nas considerações anteriores sobre o potencial efeito do suco de uva em estudos *ex vivo* em humanos (Andrade et al., 2008), onde uma quantidade de 300 mL de suco para cada 70 kg de massa corporal foi utilizada com sucesso. A ingestão de alimentos foi severamente diminuída em 63 ± 4% no primeiro dia após a irradiação, mas aumentou depois disso, para ser totalmente retomada cinco dias após, sem diferenças entre os grupos (dados não mostrados). O consumo de água aumentou em 49 ± 5% em todos os grupos, irradiados e controles, no dia da irradiação, mas voltou ao normal a partir do dia seguinte. Este efeito foi atribuído ao procedimento anestésico a que todos os animais foram submetidos, não importando o grupo a que pertenciam.

Adicionalmente, uma modulação diferencial no peso de órgãos específicos foi obsevada. Diferenças significativas em relação aos grupos não-irradiados (Tabela IV, **Artigo** 1) foram encontradas no fígado e baço, mas não para o coração e os rins. No caso, o grupo irradiado sem suco (GR) mostrou considerável perda de peso do fígado em comparação com o grupo MR. Não houve diferença de peso do fígado entre os grupos MR, MN e GN.

Estes resultados sugerem que o suco de uva parece proteger contra efeitos da radiação associados à perda de peso corporal sendo corroborado por um estudo anterior que sugeriu que o composto bioativo resveratrol, que está presente no suco de uva teria efeito

radioprotetor (Koide et al., 2008). A composição da uva e seus subprodutos não-alcoólicos e alcoólicos como o suco de uva e o vinho, respectivamente mostra uma quantidade importante de compostos fenólicos bioativos tais como resveratrol, quercetina e rutina. Medidas de detecção e quantificação destes compostos no suco de uva que foi administrado aos ratos mostraram presença de altos níveis destes compostos (Mansur et al., 2010).

Possíveis ações radiomodificadoras associadas ao consumo do suco de uva provavelmente estão relacionadas aos efeitos biológicos antioxidantes e antiinflamatórios destes compostos. Os flavonóides são conhecidos por terem importantes atividades antioxidantes e antiinflamatórias (Gonzalez-Gallego et al., 2007). O resveratrol tem sido desde há muito estudado não somente como um potencial antioxidante (Dani, 2008) e radiomodificador (Reagan-Shaw S et al., 2008), mas também por causa de sua ação antimutagênica, o seu papel na mediação dos efeitos anti-inflamatórios, ação anticarcinogênica (Jang et al., 1997). Resveratrol também foi relacionado com processos apoptóticos causados por citocinas, agentes quimioterápicos e radiação ionizante (Aggarwal et al., 2004).

Entretanto, se tais flavonóides possuem efeito radiomodificador a detecção de efeitos sistêmicos seria esperada. Assim, como a exposição à radiação provoca efeitos diretos sobre o perfil hematológico dos indivíduos, observações foram também conduzidas considerando o potencial efeito do suco de uva sobre parâmetros hematológicos dos ratos expostos ou não a radiação ionizante.

5.2 Alterações hematológicas

Efeitos do suco de uva sobre parâmetros hematológicos de ratos irradiados foram observados no presente estudo não indicando, entretanto, nenhum efeito radioprotetor contundente deste alimento. Como pode ser visto na Tabela I (**Artigo 1**) a contagem de leucócitos diminuiu com diferenças significativas para todas as amostras considerando MR e GR em relação aos respectivos controles. Linfócitos caíram dramaticamente e esta queda pode ser interrompida por uma elevação na contagem de granulócitos seguida por uma pseudo-recuperação final devido à liberação de glóbulos danificados que interferem na contagem (Fliedner et al., 2001). Monócitos diminuíram significativamente em comparação aos controles apenas para 24 e 48 horas, o que pode sugerir neste período uma resposta a possíveis infecções.

A contagem de eritrócitos (Tabela III, **Artigo 1**) apresentou valores normais para as primeiras 48 horas e uma diminuição significativa 16 dias após a irradiação, um indicativo de que um quadro anêmico foi instalado. Níveis de hemoglobina diminuíram significativamente em 48 horas para o grupo MR, e em 16 dias em MR e GR, respectivamente, aos controles.

Para os níveis de hemoglobina nos grupos MR e GR, em 16 dias, há uma tendência de manter os valores mais altos para o grupo MR, com maior variabilidade encontrada no grupo GR. Esta tendência pode estar relacionada à diminuição de absorção de glicose e frutose no intestino delgado dos ratos irradiados, com o aumento da produção de CO₂ no sangue periférico, levando a um aumento da concentração de hemoglobina (Bullard et al., 1956; Hill et al., 1956). Alterações na hemoglobina e contagem de eritrócitos são também de se esperar após um prejuízo significativo à medula óssea posteriormente à irradiação com raios-X, como mostrado por Umegaki et al. (2001). Os valores de hematócrito foram estatisticamente distintos para grupos MR e GR relativamente aos controles somente em 16 dias.

Considerando tais resultados, pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que levanta a possível relação entre aumento nos níveis de hemoglobina no sangue periférico com possíveis falhas na absorção de açúcares no intestino após irradiação X de corpo inteiro e danos hepáticos.

A contagem de plaquetas mostrou significância estatística para MR e GR respectivamente para os controles apenas aos 16 dias. Dois animais do grupo GR, no entanto, apresentaram sangramento nasal, possivelmente relacionado com a diminuição de plaquetas, em contraste com MR grupo onde nenhum sangramento foi observado durante o período experimental.

As contagens relativas (%) de linfócitos (Tabela II) foram significativamente menores para os grupos MR e GR, respectivamente aos controles em 6, 24 e 48 horas, mas não aos 16 dias.

Ao comparar os animais irradiados para 6 e 48 horas pós-irradiação, a contagem total de leucócitos foi maior no GR em relação ao MR (tabela I). No entanto, a variabilidade muito maior que constam os dados do grupo GR indica que algum cuidado deve ser tomado quando descartar possíveis efeitos radioprotetores do suco de uva.

O fato de que animais do grupo irradiado não suplementado com o suco de uva (GR) terem apresentado sangramento nasal no 15° dia do experimento é potencial indicador de problemas relacionados à coagulação e processos inflamatórios, que podem ter sido reduzidos pela ingestão do suco no grupo suplementado com este alimento. Este resultado é de fundamental relevância para casos reais de exposição à radiação em casos de emergência,

resgate e ações miltiares onde há a possibilidade de injúrias combinadas como, por exemplo, irradiação e trauma. Experimentos considerando curvas de sobrevivência podem ser motivados pelo evento do sangramento nasal dos animais irradiados e não suplementados com suco de uva e indicar fatores de redução de dose. Entretanto, estes experimentos podem ser mais bem explorados se conduzidos inicialmente *in vitro* em estudos complementares ao trabalho aqui apresentado.

O percentual de linfócitos foi maior no grupo GR quando comparado ao MR, mas a contagem percentual de granulócitos foi maior no grupo MR em relação ao grupo GR, o que sugere uma possibilidade real de recuperação da medula óssea danificada, de acordo com a proposta de efeito radiomodificador positivo sobre a medula óssea da suplementação com suco de uva. Em um quadro geral, estes resultados apontam para danos maciços na medula óssea como conseqüência da irradiação aguda de corpo inteiro. Novos experimentos devem ser realizados em diferentes tempos pós-irradiação com células da medula óssea para esclarecer a evolução temporal destes efeitos radiomodificadores.

Em síntese, o conjunto dos resultados sugere que a suplementação com suco de uva não teria efeito radiomodificador positivo contundente sobre alterações hematológicas radioinduzidas. Esta conclusão é importante uma vez que um método clássico de avaliação da dose absorvida por exposição externa de corpo inteiro apóia-se na contagem absoluta de linfócitos. Este método, conhecido como Curvas de Andrews (Andrews G, 1980) avalia a cinética de depleção de linfócitos relacionando a dinâmica populacional celular com a dose absorvida. Assim, o efeito do suco de uva sobre os parâmetros hematológicos é tal que não interfere na dinâmica celular e na avaliação da dose absorvida por um método clássico.

Uma vez averiguado o efeito radiomodificador do suco sobre o peso corporal e os parâmetros hematológicos foi conduzida uma investigação adicional dos possíveis efeitos causais desta proteção. Como a radiação induz a um estado intenso de estresse oxidativo, que por sua vez causa alterações homeostáticas importantes em rotas metabólicas que incluem alterações do estado imunológico (em especial o inflamatório) entre outras, foi conduzida uma análise do efeito radiomodificador do suco de uva em marcadores bioquímicos e genômicos.

Dada a impossibilidade de análise de todos os órgãos corporais, as investigações realizadas foram concentradas no fígado. A escolha deste órgão de seu porque estudos anteriores iniciais conduzidos ainda na década de 50, mostraram que o fígado é um órgão radiosensível. Supplee et al. (1956) relataram aumento do peso deste órgão 6h após irradiação X em ratos, em condições semelhantes às desenvolvidas no trabalho de tese. Como o presente estudo foi delineado para investigar o efeito protetor do suco de uva após 15 dias, não é

possível afirmar se ocorreram efeitos imediatos pós-irradiação como aumento no tamanho e peso do fígado. De qualquer modo, os resultados aqui obtidos corroboram a ocorrência de efeitos sobre o peso do fígado provocados pela exposição à radiação e sugerem a inibição de um quadro de perda de massa hepática pela suplementação com suco de uva.

A seguir os principais resultados obtidos sobre o efeito da suplementação do suco de uva em indicadores bioquímicos e genômicos no fígado que estão relacionados à SAR são discutidos.

5.3 Alterações hepato-oxidativas e hepato-metabólicas

Com base em investigações recentes e anteriores que mostraram efeito radioprotetor de extratos de sementes de uva em ratos (Carsten et al., 2008; Saada et al., 2009) sob condições controladas (compostos administrados por gavagem) foi testado se a ingestão *ad libdtum* do suco de uva (BGJ) teria alguma ação radioprotetora em ratos irradiados com raios X de forma aguda e de corpo inteiro (**Artigo 2**).

Nas condições experimentais deste estudo foi observada que a ingestão do BGJ *ad libitum* exerce alguma proteção contra o estresse oxidativo induzido por radiação ionizante. No entanto, é importante se discutir algumas questões metodológicas.

Inicialmente, é importante ressaltar que os resultados encontrados aqui foram verificados 15 dias após a exposição à radiação. O status oxidativo no fígado foi avaliado, uma vez que a tolerância do fígado para exposição à radiação é polêmica e em um estudo anterior encontrou-se efeito da ingestão de BGJ sobre o fígado (Andrade et al., 2009a). Aqui, observa-se que a peroxidação lipídica foi maior nos ratos irradiados, sem suplementação com BGJ. A estimativa do MDA aumentou no grupo não suplementado com suco sendo sugestivo de proteção oferecida pelo consumo de BGJ *ad libitum* contra a peroxidação lipídica no fígado. Os resultados corroboram estudos anteriores que investigaram o papel radioprotetor do extrato de semente de uva (GSE), administrada por gavagem. Cetin e colegas (2008) constataram que o GSE protege a membrana hepatocelular de danos oxidativos e, conseqüentemente, da peroxidação lipídica em ratos irradiados.

Estudos relatando efeitos da GSE contra a exposição à radiação ionizante em outros órgãos também foram encontrados. Saada e colaboradores (2009) observaram que o extrato de semente de uva (GSE administrado por gavagem) ao longo de 14 dias antes da irradiação

atenuou o estresse oxidativo no coração e tecidos do pâncreas. Investigação realizada por Enginar et al. (2007) avaliou o efeito potencial radiomodificador positivo do GSE e suplementos de vitamina E em linfócitos do sangue. Eles descobriram que GSE reforça da capacidade antioxidante diminuindo a peroxidação lipídica induzida em amostras de sangue de ratos expostos à radiação-X. Portanto, considerando a influência dos produtos de uvas sobre a peroxidação lipídica, nossos resultados sugerem que a ingestão oral *ad libitum* do suco de uva tem alguma função protetora, como observado nas investigações com doses controladas.

O sistema antioxidante primário do fígado (SOD, CAT e GPx) como um todo foi muito afetado. Redução considerável da atividade da SOD foi encontrada no grupo I-GL, sugestivo de insuficiência sobre a dismutação de superóxidos (O2*), a produção, que representa a primeira onda de geração de radicais livres. A superprodução do radical hidroxila (*OH), uma segunda onda, poderia vir a partir desses desequilíbrios, com sérias implicações possíveis para a funcionalidade do fígado. O grupo irradiado suplementado com BGJ (I-GJ) foi encontrado em níveis de controle, que é indicativo do sistema antioxidante primário recuperando ou forte atividade *scavenger* oferecida, possivelmente, pelo seu teor de flavonóides. Foi encontrado um aumento significativo na expressão da SOD medida por *western blotting* no grupo I-GJ quando comparado ao I-GL e controle NI-GL (figura 3A, Artigo 2). O aumento na expressão de SOD é possivelmente um efeito do suco de uva melhorando a primeira barreira no sistema antioxidante primário. Resultado semelhante foi descrito por Cetin e colaboradores (2008) que descobriram que a irradiação diminuiu a atividade da superóxido dismutase nos tecidos homogenizados de fígado e essas alterações foram significativamente revertidas pelo tratamento com extrato de sementes de uva.

As enzimas catalase (CAT) e SODmit foram encontradas em níveis de controle para todos os grupos. Este resultado é significativo e permite inferir dois pontos importantes: (a) CAT inalterada sugere que o problema está na fase de superóxido do estresse oxidativo, indicando que a ingestão do suco de uva parece ser capaz de atuar na primeira fase (fase de superóxido) da produção de radicais livres no fígado, e (b) SODmit com níveis de controle é sugestivo de que o dano está no nível citoplasmático, sem dano aparente à mitocôndria. Como Cecin e colaboradores (2008) verificaram que a irradiação diminuiu os níveis de CAT, embora não seja o mesmo produto e não nas mesmas condições experimentais, estudos complementares precisam ser realizados para confirmar os resultados encontrados no trabalho de tese.

A diminuição na atividade da GPx no grupo irradiado não suplementado (I-GL) pode ser indicativo de ação reduzida do sistema antioxidante não-enzimático (GSH, por exemplo). A glutationa peroxidase também pode metabolizar hidroperóxidos lipídicos a ácidos graxos não reativos. Assim, variações na atividade da GPx podem ser ligadas a variações na peroxidação lipídica. Para o grupo suplementado com BGJ (I-GJ) a atividade da GPx foi encontrada em níveis de controle, sugestivo de ação protetora do BGJ sobre o sistema antioxidante primário. Além disso, uma diminuição da concentração de GSH é encontrada para o grupo irradiado não suplementado I-GL. Por outro lado, o grupo suplementado BGJ apresentou GSH intracelular no nível de controle. Como GSH desempenha um papel importante na catalização de H₂O₂ este resultado está de acordo ao encontrado para a CAT corroborando a ideia de ação protetora do BGJ na fase inicial do estresse oxidativo. A diminuição de GSH e atividade da GPx no grupo I-GL provavelmente são correlacionados.

O grupo suplementado com BGJ mostrou um aumento da razão GSH / GSSG, devido à menor quantidade de GSSG no grupo I-GJ. O suco de uva parece aumentar a quantidade de GSH intracelular no fígado, que se torna disponível para servir como cofactor para ação da GPx e aumento da eliminação de espécies reativas.

A fim de investigar a extensão do dano induzido pela radiação transmitida ao tecido do fígado, p53 e PARP-1 foram avaliadas como marcadores de morte celular. Infelizmente, não encontramos estudos semelhantes, investigando o efeito de produtos de uva na expressão da p53, e PARP-1 como biomarcadores para danos induzidos por radiação X. Como pode ser visto na Figura 3B do **artigo 2**, considerada a PARP-1, I-GJ apresentou diferenças em relação a I-GL e NI-GL, sugestivo de uma possível tendência pró-apoptótica, embora a expressão da proteína p53 no fígado tenha sido a mesma para todos os grupos (Figura 3C). Além disso, não foram observadas alterações histológicas, bem como as diferenças de danos no DNA entre os tratamentos. Estes resultados podem indicar que, na fase inicial da exposição aguda à radiação de corpo inteiro aqui investigada, não há nenhuma atividade detectável de apoptose, alterações histológicas e danos ao DNA. No entanto, estudos complementares para avaliar a radioprotectividade crônica da ingestão *ad libitum* de BGJ precisam ser realizados a fim de observar a ação radiomodificadora da ingestão do BGJ sobre estes parâmetros biológicos.

Em síntese, o conjunto dos resultados sugere que o efeito radiomodificador protetor do suco de uva está relacionado à diminuição do impacto oxidativo da radiação ionizante. Entretanto, investigações adicionais analisando tal impacto em outros órgãos e também em outras condições de exposição da radiação (dose, taxa de dose e tipo de radiação) devem ser realizadas com a perspectiva de se complementar e reproduzir os achados aqui descritos.

Por fim, é importante comentar aspectos relacionados à construção do delineamento experimental e suas possíveis limitações metológicas.

5.4 Considerações metodológicas

Uma vez que existem diversos tipos de radiação ionizante é importante que seja comentado alguns aspectos relacionados à escolha dos raios-X para a realização dos experimentos aqui apresentados.

Os raios-X utilizados nos experimentos foram estrategicamente escolhidos em função da relativa baixa energia e razoável poder de penetração em amostras biológicas, além de suporte na literatura. A baixa energia dos raios-X é preferencial para efeitos de ejeção eletrônica por efeito fotoelétrico, o que favorece os processos de ionização e consequente aumento da toxicidade radioinduzida.

Um dos aspectos críticos no estudo foi a escolha de como seria feita a suplementação do suco de uva em ratos. Tradicionalmente estudos em modelos experimentais que testam fármacos ou compostos utilizam um sistem altamente controlado de suplementação no qual o mais comum é a gavagem ou a aplicação intraperitoneal dos mesmos. Com esta estratégia metodológica os pesquisadores conseguem saber a exata quantidade e concentração de composto que foi administrada.

Ainda que este procedimento metodológico seja altamente qualificado, como o objeto do estudo era a averiguação da suplementação de um alimento e seus efeitos radioprotetores em sintomas da SAR a utilização da gavagem como método experimental de administração do suco apresentava limitações importantes. Uma delas diz respeito ao possivel efeito do consumo do suco no comportamento alimentar do rato (efeito anorético). Como estudo anterior (Saada et al., 2009) havia já descrito que o extrato de sementes de uva apresentava efeito radiomodificador protetor no metabolismo oxidativo e tais autores utilizaram a gavagem como método de administração, o estudo aqui realizado dedicou sua atenção em averiguar o quanto este efeito seria mantido em condições mais próximas a realidade humana. Por este motivo, conscientes das limitações associadas que o consumo *ad libidium* do suco de uva pudesse causar, principalmente ao possível aumento na variabilidade dos resultados, optou-se por este método. Os resultados obtidos sugerem que mesmo em situação de escolha no consumo do suco de uva e variação na quantidade de ingestão diária por animal (2 a 10

mL), este alimento possui claros efeitos de proteção contra sintomas agudos característicos da SAR.

Outra questão que poderia ser limitante no estudo diz respeito ao tamanho pequeno da amostra investigada. Uma vez que estes experimentos foram conduzidos nas dependências do Departamento de Biomedicina da Universidade de León, Espanha, que segue protocolos rigorosos de ética em pesquisa animal, a amostra investigada foi considerada adequada para esta primeira etapa da investigação sobre os efeitos radiomodificadores positivos da suplementação do suco de uva. Com base nos resultados obtidos, investigações adicionais deverão ser delineadas e conduzidas, incluindo a partir dos resultados obtidos, uma metodologia em que a ingestão controlada de suco de uva (administrada por gavagem) seja realizada a fim de refinar as análises e diminuir a variação na resposta das mesmas.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos dos trabalhos apresentados que compõem a tese e suas possíveis limitações metodológicas relacionadas pode ser inferido que existe efeito radioprotetor do suco de uva pelos seguintes aspectos observados no estudo:

- Modulação diferencial da perda de peso corporal.
- Modulação do metabolismo oxidativo uma vez que a maior parte destes parâmetros foram similares comparando o grupo irradiado tratado com o suco de uva aos grupos não-irradiados.
- O suco de uva parece agir no sistema antioxidante primário hepático em fases iniciais do estresse induzido por radiação, sendo razoável inferir que a ação (provavelmente dos flavonóides) concentra-se na fase de dismutação dos superóxidos.
- Uma vez que não foi verificado dano no DNA e alterações histológicas no grupo irradiado não foi possível avaliar o efeito radiomodificador do suco nestas variáveis.
- Estudos complementares precisam ser conduzidos considerando ingestão controlada e não controlada, dentre outras variáveis não avaliadas aqui.
- O suco de uva utilizado no trabalho de tese por não apresentar ação radiomodificadora sobre os parâmetros hematológicos, não interefere no protocolo de Andrews, permitindo a estimativa da dose. Esta característica potencializa ainda mais sua aplicação em operações envolvendo potencial exposição à campos de radiação ionizante.
- Os resultados apóiam a hipótese de que o suco de uva utilizado é um alimento com efeito radioprotetor e com potencial para aplicação em operações militares e de emergências envolvendo risco potencial de exposição radiológica ou nuclear aguda de corpo inteiro.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo da Radiobiologia é moderno e carece de maiores investimentos para seu crescimento tanto no Brasil como no Globo como um todo. A exposição às radiações de diversas origens, energias e formas é inevitável e o seu uso está cada vez mais difundido na Sociedade Moderna.

Desta forma, aproveitando o caráter multidisciplinar desta particular ciência, faz-se necessário a criação de um sistema integrado de pesquisa que investigue os fenômenos radiobiológicos à luz das reais necessidades humanas, como a radioterapia e proteção aos envolvidos tanto na geração de energia como no atendimento às emergências, além do especial capítulo das ações miltiares e contra terrorismo.

Há a perspectiva de desenvolvimento de estudos mais avançados envolvendo modelos celulares e *in vivo* dando continuidade aos resultados provenientes deste trabalho, em parceria com o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), órgão do Governo Federal com sede em São Paulo, o Centro Tecnológico do Exército (CTEx), Instituto Militar de Engenharia (IME) e o Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD), todos com sede no Rio de Janeiro.

Dos resultados referentes à expressão das proteínas envolvidas na resposta primária antioxidante há a perspectiva de um trabalho conjunto com a Universidade de Sydney na Austrália, onde se propõe desenvolver um modelo de estudo da resposta mitocondrial à irradiação em ambientes enriquecidos com flavonóides. Este modelo foi sugestão de nosso grupo e pretende verificar alterações da atividade enzimática no sítio de enzimas específicas da cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial.

8 REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B., et al. "Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies." Anticancer Res 24(5A): 2783-840, 2004.
- ALBANESE, J. DAINIAK, N. "Modulation of intercellular communication mediated at the cell surface and on extracellular, plasma membrane-derived vesicles by ionizing radiation." Exp Hematol 31(6): 455-64, 2003.
- ANDERSON, D. "Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage." Mutat Res 350(1): 103-8, 1996.
- ANDLAUER, W. "Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook." Food Research International 35: 171-176, 2002.
- ANDRADE, E. A., et al. Projeto Tabagismo e Nutrigenética: efeito potencial radioprotector do suco de uva orgánico (*Vitis Labrusca*): estudo preliminar ex vivo. 23ª Jornada Acadêmica Integrada, 2008.
- ANDRADE, E. R., et al. "Effect Of Black Grape Juice Intake On Liver Lipoperoxidation And Body Weight Loss In Whole Body X-Irradiated Rats." J Med CBR Def 7: 1-12, 2009a.
- ANDRADE, E. R., et al. "Radiomodifying effect of organic grape juice supplementation on hematological parameters and organ weight in whole-body X-irradiation in rats." Nutr Hosp 24(3): 297-303, 2009b.
- ANDREWS G. Medical management of accidental total bodyirradiation. In: Hubner RF, Fry SF, eds. The Medical Basis for Radiation Accident Preparedness. New York: Elsevier North Holland Inc., 1980; 297–310.
- ARORA, R., D. GUPTA, et al. "Radioprotection by plant products: present status and future prospects." Phytother Res 19(1): 1-22, 2005.
- BEN-AMOTZ, A., et al. "Effect of natural beta-carotene supplementation in children exposed to radiation from the Chernobyl accident." Radiat Environ Biophys 37(3): 187-93, 1998.

- BHATTATHIRI, V. N., et al. "Influence of plasma GSH level on acute radiation mucositis of the oral cavity." Int J Radiat Oncol Biol Phys 29(2): 383-6, 1994.
- BOLUS, N. E. "Basic review of radiation biology and terminology." J Nucl Med Technol 29(2): 67-73; test 76-7, 2001.
- BROWNE, D., et al. "Protocol for the treatment of radiation injuries." Adv Space Res 12(2-3): 165-8, 1992.
- BUKAN, N., et al. "Antioxidant tolerance of kidney after irradiation." Indian J Exp Biol 41(3): 267-9, 2003.
- BULLARD, D., et al. "Effect of total body irradiation on absorption of sugars from the small intestine." Am J Physiol 186(3): 549-53, 1956.
- CAO, G., et al. "Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships." Free Radic Biol Med 22(5): 749-60, 1997.
- CAROLINE DANI, et al. "Intake of Purple Grape Juice as a Hepatoprotective Agent in Wistar Rats." J Med Food 11 (1) 127–132, 2008.
- CARSTEN, R. et al. "Resveratrol reduces radiation-induced chromosome aberration frequencies in mouse bone marrow cells." Radiat Res 169(6): 633-8, 2008.
- CASSATT, D. R., et al. "Preclinical modeling of improved amifostine (Ethyol) use in radiation therapy." Semin Radiat Oncol 12(1 Suppl 1): 97-102, 2002.
- CASTILLO, J., et al. "Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (Vitis vinifera): comparative study versus other phenolic and organic compounds." J Agric Food Chem 48(5): 1738-45, 2000.
- CETIN, A., et al. "The effect of grape seed extract on radiation-induced oxidative stress in the rat liver." Turk J Gastroenterol 19(2): 92-8, 2008.
- CHANDRA, S.; STEFANI, S. "Plasma membrane as a sensitive target in radiation-induced cell injury and death: an ultrastructural study." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 40(3): 305-11, 1981.

- CHATTERJEE, S. N.; S. AGARWAL "Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation." Free Radic Biol Med 4(1): 51-72, 1988.
- CNEN. Diretrizes Básicas de Radioproteção. Rio de Janeiro, Comissão Nacional de Energia Nuclear, 2005.
- COLEMAN, C. N., et al. "Molecular and cellular biology of moderate-dose (1-10 Gy) radiation and potential mechanisms of radiation protection: report of a workshop at Bethesda, Maryland, December 17-18, 2001." Radiat Res 159(6): 812-34, 2003.
- COTELLE, N. "Role of flavonoids in oxidative stress." Curr Top Med Chem 1(6): 569-90, 2001.
- CZAPSKI, G. "Nature of Oxygen Containing Radicals." *in*: Radiation Chemistry and Photochemistry of Aqueous Solutions. Annual Progress Report, Sep. 1979 Jul 1980. Technical Report, Hebrew Univ., Jerusalem, 1980
- DANI C, et al. "Intake of purple grape juice as a hepatoprotective agent in Wistar rats." J Med Food. 11(1): 127-32, 2008.
- DECKER, E. A. "Phenolics: prooxidants or antioxidants?" Nutr Rev 55(11 Pt 1): 396-8, 1997.
- DEGER, Y., et al. "Effects of X-ray radiation on lipid peroxidation and antioxidant systems in rabbits treated with antioxidant compounds." Biol Trace Elem Res 94(2): 149-56 2003.
- DONS, R.F. Triage and treatment of radiation, TMM Publications, 1989.
- EMAMI, S., et al. "Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents." Bioorg Med Chem Lett 17(1): 45-8, 2007.
- EMERIT, I., et al. "Radiation-induced clastogenic factors: anticlastogenic effect of Ginkgo biloba extract." Free Radic Biol Med 18(6): 985-91, 1995.
- EMERIT, I., et al. "Oxidative stress-related clastogenic factors in plasma from Chernobyl liquidators: protective effects of antioxidant plant phenols, vitamins and oligoelements." Mutat Res 377(2): 239-46, 1997.

- EMERIT, J.; MICHELSON, A. M. "Free radicals in medicine and biology." Sem Hop 58(45): 2670-5, 1982.
- ENGINAR, H., et al. "Effect of grape seed extract on lipid peroxidation, antioxidant activity and peripheral blood lymphocytes in rats exposed to x-radiation." Phytother Res 21(11): 1029-35, 2007.
- EPPERLY, M. et al. "Modulation of radiation-induced life shortening by systemic intravenous MnSOD-plasmid liposome gene therapy." Radiat Res 170(4): 437-43, 2008.
- FLIEDNER, T. M. et al. Organ specific manifestations of the acute radiation syndrom. Medical Management of Radiation Accidents: Manual on the Acute Radiation Syndrome. B. I. o. Radiology. Oxford, British Institute of Radiology, 3: 13-38, 2001.
- GAETANI, G. F. et al. "Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes." Blood 73(1): 334-9, 1989.
- GIAMBARRESI, L. et al. Radioprotectants Military Radiobiology. I. Academic Press. London, Academic Press: 265–301, 1987.
- GIBSON, D. D. et al. "GSH-dependent inhibition of lipid peroxidation: properties of a potent cytosolic system which protects cell membranes." Lipids 20(10): 704-11, 1985.
- GONZALEZ-GALLEGO, J. et al. "Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids." Nutr Hosp 22(3): 287-93, 2007.
- GOW, A. J.; ISCHIROPOULOS, H. "Nitric oxide chemistry and cellular signaling." J Cell Physiol 187(3): 277-82, 2001.
- GROEN, H. J. et al. "Red blood cell glutathione levels in lung cancer patients treated by radiation and continuously infused carboplatin." Anticancer Res 16(2): 1033-7, 1996.
- HABER, A. H.; ROTHSTEIN, B. E. "Radiosensitivity and Rate of Cell Division: "Law of Bergonié and Tribondeau" "Science 163(3873): 1338 1339, 1969.

- HAKSAR, A. et al. "Zingiber officinale exhibits behavioral radioprotection against radiation-induced CTA in a gender-specific manner." Pharmacol Biochem Behav 84(2): 179-88., 2006
- HALL, E. J. Radiobiology for the Radiologist. Philadelphia, Lippincott Wilkins & Williams, 2006.
- HALLIWELL, B. "Free radicals and antioxidants: a personal view." Nutr Rev 52(8 Pt 1): 253-65, 1994.
- HARTMAN, P. E.; SHANKEL, D. M. "Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules." Environ Mol Mutagen 15(3): 145-82, 1990.
- HERTOG, M. G., et al. "Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands." Nutr Cancer 20(1): 21-9, 1993.
- HILL, R. et al. "Metabolism of glucose and fructose in liver of the rat subjected to whole-body x-irradiation." Am J Physiol 187(3): 417-21, 1956.
- IANZINI, F. et al. "Gamma-irradiation effects on phosphatidylcholine multilayer liposomes: calorimetric, NMR, and spectrofluorimetric studies." Radiat Res 98(1): 154-66, 1984.
- IARMONENKO, S. P. "[Radiomodifiers and the progress of radiation oncology]." Vopr Onkol 41(2): 93-4, 1995.
- JADHAV, G. K. et al. "Possible role of glutathione in predicting radiotherapy response of cervix cancer." Int J Radiat Oncol Biol Phys 41(1): 3-5, 1998.
- JANG, M. et al. "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes." Science 275(5297): 218-20, 1997.
- JIANG, J. et al. "A mitochondria-targeted nitroxide/hemigramicidin S conjugate protects mouse embryonic cells against gamma irradiation." Int J Radiat Oncol Biol Phys 70(3): 816-25, 2008.
- JIN, L. H. et al. "Protective effects of puerarin on radiation injury of experimental rats." Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao 3(1): 43-5, 2005.

- JOHANSEN "The contribution of water-free radicals to the X-ray inactivation of bacteria." Cellular Radiation Biology: 103–106, 1965.
- JUNQUEIRA, J. C. Biologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2005.
- KALININA, E. V. et al. "Increase in radiation resistance of an organism after administration of metabolic drug MR-33." Radiats Biol Radioecol 39(2-3): 272-6, 1999.
- KANDASAMY, S. B. et al. "Involvement of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in attenuation of radiation-induced hyperthermia by interleukin-1 alpha in rats." Brain Res 606(1): 106-10, 1993.
- KAPLAN, I. Física Nuclear. Rio de Janeiro, 1978.
- KAPUT, J. et al. "The case for strategic international alliances to harness nutritional genomics for public and personal health." Br J Nutr 94(5): 623-32, 2005.
- KAUR M. et al. "Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products." J Nutr. 139(9): 1806S-12S, 2009.
- KAUR M. et al. "Grape seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma cells." Nutr Cancer, 60 (Suppl 1): 2-11, 2008.
- KAYA, H. et al. "The effect of melatonin on lipid peroxidation during radiotherapy in female rats." Strahlenther Onkol 175(6): 285-8, 1999.
- KHODAREV, N. N. et al. "Interaction of amifostine and ionizing radiation on transcriptional patterns of apoptotic genes expressed in human microvascular endothelial cells (HMEC)." Int J Radiat Oncol Biol Phys 60(2): 553-63, 2004.
- KHOZOUZ, R. F. et al. "Radiation-induced liver disease." J Clin Oncol 26(29): 4844-5, 2008.
- KOENIG, K. L. et al. "Medical treatment of radiological casualties: current concepts." Ann Emerg Med 45(6): 643-52, 2005.
- KOIDE, K. et al. Acetylated Resveratrol: A New Small Molecule Radioprotector.*in*: Annual Meeting of American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO), 2008.

- KOJIMA, S. et al. "Localization of glutathione and induction of glutathione synthesis-related proteins in mouse brain by low doses of gamma-rays." Brain Res 808(2): 262-9, 1998.
- LEACH, J. K. et al. "Activation of constitutive nitric-oxide synthase activity is an early signaling event induced by ionizing radiation." J Biol Chem 277(18): 15400-6, 2002.
- LEACH, J. K. et al. "Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen." Cancer Res 61(10): 3894-901, 2001.
- LEHNERT, S. Biomolecular Action of Ionizing Radiation. Medical Physics and Biomedical Engineering. Montreal, Taylor & Francis Group, LLC, 2008.
- LEIFERT, W.R. et al. "Cardioprotective actions of grape polyphenols." Nutr Res. 28(11): 729-37, 2008.
- LEOŠ NAVRÁTIL, J. R. et al. "Changes in selected parameters of the antioxidant system in radiation damage to the organism." Journal of APPLIED BIOMEDICINE 6: 195–201, 2008.
- LIU, S. et al. "Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes." Toxicol In Vitro, 2009.
- LLÓPIZ N, P. F. et al. "Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress." J Agric Food Chem. 52(5): 1083-7, 2004.
- MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. "Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients." Faseb J 1(6): 441-5, 1987.
- MAISIN, J. R. "Bacq and Alexander Award lecture--chemical radioprotection: past, present, and future prospects." Int J Radiat Biol 73(4): 443-50, 1988.
- MANSUR, M. M. et al. Antioxidant Proprierties of no-Alcoholic Red Grape Products: Red Grape Juices and Vinegars. Journal of Medicinal Food, 2010, *in press*.
- MANTENA, S. K.; and KATIYAR, S. K. "Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-kappaB signaling in human epidermal keratinocytes." Free Radic Biol Med 40(9): 1603-14, 2006.

- MARCHENKO, M. M. et al. "Influence of small doses of fractionated X-ray radiation on the activity of histone-specific proteases and the content of malonic dialdehyde in chromatin of the cells of rat liver." Radiats Biol Radioecol 42(5): 488-91, 2002.
- MURPHY, P.M, **How mitochondria produce reactive oxygen species,** Biochem. J. **417**, 1–13 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20081386, 2000.
- MAZUR, L. "Radioprotective effects of the thiols GSH and WR-2721 against X-ray-induction of micronuclei in erythroblasts." Mutat Res 468(1): 27-33, 2000.
- MENG, X. et al. "Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice." J Agric Food Chem 52(4): 935-42, 2004.
- METTLER, F. A. et al. "Major radiation exposure--what to expect and how to respond." N Engl J Med 346(20): 1554-61, 2002.
- MIKKELSEN, R. B.; WARDMAN, P. "Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms." Oncogene 22(37): 5734-54, 2003.
- MOOK, D. G.; BRANDSEY, S. A. "Preference--aversion drinking in the rat: the nature of postingestive satiety for sugar solutions." Appetite 3(4): 297-307, 1982.
- MORALES, A. et al. "Oxidative damage of mitochondrial and nuclear DNA induced by ionizing radiation in human hepatoblastoma cells." Int J Radiat Oncol Biol Phys 42(1): 191-203, 1998.
- MULLER, H. J. "Artificial Transmutation of the Gene." Science 66(1699): 84-87, 1927.
- NAGANO, J. et al. "Bladder-cancer incidence in relation to vegetable and fruit consumption: a prospective study of atomic-bomb survivors." Int J Cancer 86(1): 132-8, 2000.
- NEKLASOVA, N. et al. "Combined use of local and systemic radiomodifiers as a new modality of cervical carcinoma therapy." Vopr Onkol 52(5): 560-4, 2006.

- NOROOZI, M. et al. "Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes." Am J Clin Nutr 67(6): 1210-8, 1998.
- OHKAWA, H. et al. "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction." Anal Biochem 95(2): 351-8, 1979.
- PARK, Y. S. "Radioprotective Effects of Red Ginseng Extracts on Antioxidants and Lipid Peroxidation in Liver in gamma-Irradiated Mice." Korean Journal of Biochemistry 26: 184-191, 1993.
- PATT, H. M. et al. "Cysteine Protection against X Irradiation." Science 110(2852): 213-214, 1949.
- POLAT, C. et al. "The effects of desferrioxamine and quercetin on hepatic ischemiareperfusion induced renal disturbance." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 74(6): 379-83, 2006.
- POMPELLA, A. "Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation." Int J Vitam Nutr Res 67(5): 289-97, 1997.
- PRIOR, R. L. "Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage." Am J Clin Nutr 78(3 Suppl): 570S-578S, 2003.
- REAGAN-SHAW S. et al. "Resveratrol Imparts Photoprotection of Normal Cells and Enhances the Efficacy of Radiation Therapy in Cancer Cells." Photochemistry and Photobiology 84: 415-421, 2008.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J. "Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food." Biochem Soc Trans 24(3): 790-5, 1996.
- ROOTS, R.; OKADA, S. "Protection of DNA molecules of cultured mammalian cells from radiation-induced single-strand scissions by various alcohols and SH compounds." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 21(4): 329-42, 1972.
- RUSSANOV, E. et al. "X-irradiation effects on lipid peroxidation and superoxide dismutase and catalase activities in copper deficient and copper loaded rat liver." Acta Physiol Pharmacol Bulg 5(2): 73-8, 1979.

- SAADA, H. N. et al. "Grape seed extract Vitis vinifera protects against radiation-induced oxidative damage and metabolic disorders in rats." Phytother Res 23(3): 434-8, 2009.
- SAADA, H. N. et al. "Effectiveness of Aloe vera on the antioxidant status of different tissues in irradiated rats." Pharmazie 58(12): 929-31, 2003.
- SAIJA, A. et al. "Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes." Free Radic Biol Med 19(4): 481-6, 1995.
- SAPORA, O. et al. "Relationships between cell killing, mutation induction and DNA damage in X-irradiated V79 cells: the influence of oxygen and DMSO." Int J Radiat Biol 60(3): 467-82, 1991.
- SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." Free Radic Biol Med 30(11): 1191-212, 2001.
- SCHLACHTERMAN, A. et al. "Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model." Transl Oncol 1(1): 19-27, 2008.
- SONNTAG, V. The Chemical Basis of Radiation Biology. London, Taylor and Francis, 1987.
- STANIMIROVIC, D. B. et al. "Free radical-induced endothelial membrane dysfunction at the site of blood-brain barrier: relationship between lipid peroxidation, Na,K-ATPase activity, and 51Cr release." Neurochem Res 20(12): 1417-27, 1995.
- STARK, G. "The effect of ionizing radiation on lipid membranes." Biochim Biophys Acta 1071(2): 103-22, 1991.
- SUPPLEE, H. et al. "Enlargement of the liver in Sprague-Dawley rats following whole-body x-irradiation." Am J Physiol 185(3): 583-8, 1956.
- SWARTS SG, B. D., SEVILLA M.D., WHEELER KT "Radiation-induced DNA damage as a function of hydration. II. Oxidative base damage." Radiat. Res. 145: 304–314 1996.
- TAUHATA, L. et al. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos. Rio de Janeiro, Instituto de Radioproteção e Dosimetria, 2003.

- TUTTLE, S. et al. "Glucose-6-phosphate dehydrogenase and the oxidative pentose phosphate cycle protect cells against apoptosis induced by low doses of ionizing radiation." Radiat Res 153(6): 781-7, 2000.
- TUTTLE, S. W. et al. "Sensitivity to chemical oxidants and radiation in CHO cell lines deficient in oxidative pentose cycle activity." Int J Radiat Oncol Biol Phys 22(4): 671-5, 1992.
- UDENIGWE, C. C. et al. "Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy." Nutr Rev 66(8): 445-54, 2008.
- UMEGAKI, K. et al. "Different onsets of oxidative damage to DNA and lipids in bone marrow and liver in rats given total body irradiation." Free Radic Biol Med 31(9): 1066-74, 2001.
- VACONCELOS, S. M. L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F "Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação." Quim. Nova 30(5): 1323-1338, 2007.
- VAJRAGUPTA, O. et al. "Manganese-based complexes of radical scavengers as neuroprotective agents." Bioorg Med Chem 11(10): 2329-37, 2003.
- VAN ACKER, S. A. et al. "Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids." Free Radic Biol Med 20(3): 331-42, 1996.
- VARNES, M. E. "Inhibition of pentose cycle of A549 cells by 6-aminonicotinamide: consequences for aerobic and hypoxic radiation response and for radiosensitizer action." NCI Monogr(6): 199-203, 1988.
- VARTANIAN, L. S. et al. "Age-related peculiarities of effect of low dose ionizing radiation on blood antioxidant enzyme system status in Chernobyl's accident liquidation participant." Adv Gerontol 14: 48-54, 2004.
- WACHOWICZ, B. et al. "Effects of gamma radiation on pig platelet function." Environ Res 34(1): 1-7, 1984.
- WAECKERLE, J. F. et al. "Executive summary: developing objectives, content, and competencies for the training of emergency medical technicians, emergency

- physicians, and emergency nurses to care for casualties resulting from nuclear, biological, or chemical incidents." Ann Emerg Med 37(6): 587-601, 2001.
- WANG, Z. et al. "Protective effects of green tea on mice with the irradiating damage induced by gamma-ray." Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 34(2): 303-5, 2003.
- WEISS, J. F.; LANDAUER, M. R. "Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals." Toxicology 189(1-2): 1-20, 2003.
- WEISS, J. F.; LANDAUER, M. R. "History and development of radiation-protective agents." Int J Radiat Biol 85(7): 539-73, 2009.
- WILLIAMS, R. J. et al. "Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?" Free Radic Biol Med 36(7): 838-49, 2004.
- YADAV, M. et al. "Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: an update." J Med Food 12(3): 473-84, 2009.
- YAMAOKA K. et al. "Induction of two species of superoxide dismutase in some organs of rats by low dose X-irradiation." Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 26: 205–214, 1994.
- ZHANG, X. et al. "Radioprotection In Vitro and In Vivo by Mini Circle Plasmid Containing the Human Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Transgene." Hum Gene Ther, 2008.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

<u>Baixar</u>	livros	de	Adm	<u>inis</u>	tra	ção

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