

Avaliação dos efeitos da fenilalanina na prevenção de danos clastogênicos induzidos pela administração aguda de ciclofosfamida em camundongas prenhes e não prenhes.

Mariana de Oliveira Mauro^{1,3}; Luciano dos Santos Fronza^{1,3}; Thalita Rosa de Souza^{2,3}; João Renato Pesarini^{1,3}; Maria Tereza Pamplona Silva^{1,3}; Rodrigo Juliano Oliveira³.

¹Graduando em Biomedicina; ²Graduando em Nutrição; ³CENUGEN – Centro de Estudos em Nutrição e Genética Toxicológica da UniFil.

INTRODUÇÃO

Diversos estudos, investigações epidemiológicas e experimentos *in vivo* e *in vitro*, demonstram que existe uma associação inversamente proporcional entre o consumo de frutas e verduras e o risco de desenvolvimento de cânceres e outras patologias (FLAGG et al., 1995; WEISBURGER, 1999; ZHANG et al., 1999; WEISBURGER, 2000; FERRARI, 1991; FERRARI & TORRES, 2002).

O principal grupo de agentes inibidores da carcinogênese é representado por antioxidantes, bloqueadores de radicais livres. Além destes há os indutores da morte celular, inibidores enzimáticos (inibidores das enzimas do citocromo P450), inibidores da angiogênese, antagonistas de fatores de crescimento, hormônios e agentes reparadores de lesões do DNA (KLEINER, 1997; KELLOFF et al., 1999).

Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação (MAXWELL, 1995; SIES, 1999). A classificação mais utilizada para estas substâncias é a que as divide em dois sistemas: enzimático, composto pelas enzimas produzidas no organismo e não enzimático, composto pelas vitaminas e outros compostos naturais tais como flavonóides, licopenos e bilirrubinas (SIES, 1999) e alguns aminoácidos essenciais.

Os alimentos que possuem agentes antioxidantes constituem um dos principais grupos de alimentos com propriedades funcionais, conhecidos também como nutracêuticos ou fármaco-alimentos (FERRARI & TORRES, 2002).

O conceito de alimentos funcionais provém da hipótese de que a dieta alimentar possa controlar e modular várias funções orgânicas, contribuindo para a manutenção da saúde e reduzindo o risco do aparecimento de patologias (BORGES, 2001).

Para que um alimento seja classificado como funcional ele deve: (I) exercer efeito metabólico ou fisiológico que contribua para a saúde física e para a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas, (II) fazer parte da alimentação usual, (III) possuir efeitos positivos, obtidos através de quantidades não tóxicas que devem persistir mesmo após a suspensão de ingestão e (IV) não deve ser utilizado com o intuito de tratar ou curar doenças (MILNER, 1999).

Recentemente, o possível efeito de aminoácidos sobre a nefrotoxicidade e toxicidade da cisplatina foi investigado por Kroning *et al.* (2000). Os autores observaram que o tratamento de linhagens de células epiteliais renais com os aminoácidos metionina, *DL*-homocisteína e *N*-acetilcisteína foram eficientes na inibição da citotoxicidade da cisplatina. A modulação do aminoácido glutamina sobre a nefrotoxicidade e peroxidação lipídica induzidas pela cisplatina em ratos também foi avaliada e mostrou-se efetiva (MORA *et al.*, 2003).

A glutamina é o aminoácido mais abundante nos organismos e estudos recentes mostram a sua importância em muitas situações clínicas. Uma das propriedades importantes deste aminoácido é o seu papel crítico na síntese de glutathione. O pré-tratamento com uma única dose oral de glutamina (300mg/kg p.c.) inibiu significativamente a peroxidação lipídica, induzida sete dias após a injeção de cisplatina, além de manter os níveis de glutathione renal (MORA *et al.*, 2003).

Estudos realizados pelo Departamento de Nutrição do Centro Universitário Filadélfia – UniFil demonstraram que o aminoácido glutamina possui uma boa capacidade quimiopreventiva frente a danos causados pela administração aguda de cisplatina. Os autores Sasaki (2006), Baise (2006), Vicentini (2006) e Ferreira (2006) demonstraram boa capacidade antígeno-tóxica e anticlastogênica para este aminoácido e as porcentagens de redução de danos genotóxicos e clastogênicos variaram de 112,7% a 117,4% e 96,7% a 34,66%, respectivamente. Levando-se em conta que a fenilalanina é também um aminoácido de cadeia ramificada e possui atividade antioxidante este poderá ser testado como efetivo protetor de lesões no DNA. Assim, diante do exposto, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar os efeitos da fenilalanina na prevenção de danos clastogênicos, em sangue periférico por meio do ensaio do micronúcleo, induzidos pela administração aguda de ciclofosfamida em camundongas prenhes não prenhes.

MATERIAL E MÉTODOS

Agentes químicos

Para a indução de danos no DNA utilizou-se o agente alquilante, de ação indireta, ciclofosfamida (Fosfaseron®), na concentração final de 35,0mg/Kg de peso corpóreo (p.c.), administrada por via intraperitoneal (i.p.), diluída em solução tampão fosfato (PBS), livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} , pH 7,4.

Como quimiopreventivo foi utilizado o aminoácido fenilalanina adquirido na Farmácia de Manipulação La Fórmula (Nº Reg. 155936-0) nas concentrações de 150 e 300mg/Kg p.c.. O referido aminoácido foi diluído em PBS.

Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss (Mus musculus)*, em idade reprodutiva, com peso médio de 30g, provenientes do Centro de Estudos em Nutrição e Genética Toxicológica (CENUGEN) do Centro Universitário Filadélfia (UniFil). O experimento foi conduzido no Biotério de Nutrição Experimental - UniFil. Os animais foram mantidos em caixa de polipropileno, isolados e passaram por um período mínimo de adaptação correspondente a sete dias. A luminosidade e temperatura foram controladas; para tanto utilizou-se fotoperíodo de doze horas (12 horas de claro: 12 horas de escuro) com temperatura mantendo-se em torno de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. A alimentação foi constituída de água filtrada e ração comercial, *ad libitum*.

Delineamento experimental e técnicas de análise

Os animais foram divididos em 2 lotes iguais e mantidos em gaiolas metabólicas individuais.

O primeiro lote possuía 42 camundongas não prenhes, divididas em 6 grupos (n=7), os quais receberam os seguintes tratamentos: G1 – Grupo controle negativo - PBS 0,1mL/kg de peso corpóreo (p.c.) via oral (v.o.) e via intraperitoneal (i.p.) ; G2 – Grupo controle positivo - PBS 0,1mL/kg p.c. - v.o. e ciclofosfamida 30mg/Kg p.c. – i.p.; G3 – Grupo controle da dieta dose 1 – Fenilalanina 150mg/Kg p.c. - v.o. e PBS 0,1mL/kg p.c. – i.p.; G4 – Grupo controle da dieta dose 2 - Fenilalanina 300mg/Kg p.c. - v.o. e PBS 0,1mL/kg p.c. – i.p.; G5 – Grupo associado d1 - Fenilalanina

150mg/Kg p.c. - v.o. e ciclofosfamida 30mg/Kg p.c. – i.p.; G6 – Grupo associado d2 - Fenilalanina 300mg/Kg p.c. - v.o. e ciclofosfamida 30mg/Kg p.c. – i.p..

Para o segundo lote foi realizado o mesmo delineamento. No entanto, as fêmeas estavam prenhes. A fenilalanina foi aplicada do 8º ao 12º dia gestacional e a ciclofosfamida no 10º dia do tratamento. As coletas de sangue periférico foram realizadas num momento T0, ou seja, antes da administração de qualquer substância teste e/ou veículos. Os momentos T24 e T48 as coletas de sangue foram realizadas 24 e 48 horas após a administração da ciclofosfamida, respectivamente. Para o primeiro lote fez-se as mesmas coletas só que as fêmeas não estavam grávidas. Estas receberam fenilalanina ou veículos por dois dias consecutivos. Após receberam a ciclofosfamida e em seguida fez-se as coletas 24 e 48 horas após a administração deste quimioterápico.

Ensaio do micronúcleo em sangue periférico

Para a avaliação da clastogenicidade e da anticlastogenicidade utilizou-se a técnica de micronúcleo em sangue periférico descrita por Hayashi et al. (1990) com modificações. Para tanto, uma gota de sangue periférico foi depositada em uma lâmina previamente preparada com uma camada formada por 20µL de Alaranjado de Acridina (1,0 mg/mL). Cobriu-se a mesma com uma lamínula e estas permaneceram em *freezer* (-20°C) por um período mínimo de 48 horas. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência, combinando luz azul (488nm) e filtro alaranjado, em objetiva de 100 vezes.

Analisou-se 2000 células/animal e a estatística foi realizada através do teste t-Student ($p < 0,05$).

A porcentagem de redução dos danos do agente mutagênico pela fenilalanina foi calculada através da média do número de células com danos observadas no agente indutor de danos (ciclofosfamida) menos o número de células com danos observadas no tratamento de antimutagenicidade (fenilalanina + ciclofosfamida) x 100, dividido pelo número de células com danos observadas no agente indutor de danos menos o número de células com danos do controle (PBS).

RESULTADOS

Na tabela 1 estão apresentados a frequência, média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos referentes ao ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos fêmeas não prenhes. A análise estatística indicou que em T0 todos os grupos possuíam frequência de micronúcleos semelhantes. As médias variaram de $3,00 \pm 1,69$ a $4,71 \pm 1,70$. No entanto, momento T24 verificou-se que a ciclofosfamida (G2), mutagênico de ação indireta, foi eficiente em causar danos no DNA e a média aumentou em 10,7 vezes em relação ao grupo controle (G1). A avaliação da mutagenicidade da fenilalanina (G3 e G4) demonstrou diferença estatisticamente significativa. A menor dose de fenilalanina (G3) apresentou incremento de 5,43 vezes e a maior dose (G4) apresentou aumento de 8,94 vezes. Já a avaliação da antimutagenicidade demonstrou porcentagens de redução de danos de 57,24% e 31,64% para G5 e G6, respectivamente.

A mesma análise estatística, quando realizada 48 horas após a administração das drogas e/ou veículos, indicou que o agente indutor de danos no DNA (G2) promoveu incremento na frequência de micronúcleos de 12,62 vezes em relação ao grupo controle (G1). A análise da mutagenicidade indica que este aminoácido tem capacidade de aumentar a ocorrência de micronúcleos, em sangue periférico de camundongos fêmeas não prenhes. O incremento foi de 4,34 vezes para G3 e de 6,48 vezes para G4. A avaliação da mutagenicidade indica capacidade quimiopreventiva para ambas as doses e a porcentagem de redução de danos foi de 29,32% e 24,13% para G5 e G6, respectivamente.

Na tabela 2 encontra-se a frequência, média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos referentes ao ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos fêmeas grávidas em tratamento agudo. A análise do momento T0 indicou que os G4, G5 e G6 possuíam frequência de micronúcleos superiores àquela observada no grupo controle (G1). Na avaliação do momento T24 verificou-se que a ciclofosfamida foi eficiente em causar danos no DNA. A mutagenicidade indicou que somente a maior dose foi responsável pela elevação da frequência de micronúcleos e esta foi correspondente a 4,94 vezes mais que G1. Na antimutagenicidade observou-se eficiência quimiopreventiva somente na menor dose (G5) e as porcentagens de redução de danos foi de 43,25 e 18,47 para G5 e G6, respectivamente. No momento T48 verificou-se que aumento da frequência de micronúcleos nos testes de mutagenicidade para ambas as doses. No entanto, a

antimutagenicidade das mesmas doses foi verificada e as porcentagens de redução de danos foram de 44,37 e 37,76 para G5 e G6, respectivamente.

DISCUSSÃO

A literatura disponível e consultada na área de prevenção de lesões de DNA não tem nenhum estudo que relacione a fenilalanina e sua possível capacidade quimiopreventiva. No entanto, segundo Degáspari & Waszczyński (2004), os flavonóides são formados da combinação de derivados sintetizados da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético. Assim, este fato permite interpretações de que a suplementação de fenilalanina pode ser uma forma de dieta eficiente em prevenir danos no DNA causados por agentes clastogênicos. Outro importante fato que remete o aminoácido fenilalanina a esta capacidade preventiva é que a glutathione, um tripeptídeo (γ -glutamil-L-cisteinilglicina) capaz de capturar agentes oxidantes, é inicialmente formada pela ligação do grupamento amino de aminoácidos, sendo a fenilalanina passível de doação deste grupamento para formação da Glutathione S-Transferase (CAMPBELL; 2006).

Frente a estes relatos, percebe-se esta pesquisa como pioneira na tentativa de demonstrar a capacidade quimiopreventiva da fenilalanina e realizar suposições a respeito da suplementação na prevenção de câncer e/ou na melhoria da qualidade de vida de pacientes em quimioterapia.

Os antioxidantes agem em três linhas de defesa orgânica contra as espécies reativas de oxigênio: (I) prevenção, que se caracteriza pela proteção contra formação das substâncias agressoras; (II) interceptação de radicais livres, os quais uma vez formados iniciam suas atividades de danificação do DNA; (III) quando a prevenção e interceptação não foram efetivas e os subprodutos da atividade dos radicais livres estão sendo continuamente formados em baixas quantidades, podendo se acumular no organismo, há a necessidade de que estes sejam encaminhados à excreção pelas enzimas de detoxificação, ao mesmo tempo em que os mesmos antioxidantes modulem o sistema de reparo de DNA das células que estão sendo atacadas (KONG & LILLEHEI, 1998; SANTOS & CRUZ, 2001).

De acordo com estas descrições, o delineamento experimental proposto possui 5 doses de fenilalanina associada a uma dose de ciclofosfamida, a qual foi aplicada no meio do período de tratamento. A escolha deste delineamento se fez para que o organismo já possuísse concentrações aumentadas de fenilalanina

antes, durante e após a exposição ao quimioterápico, e assim, caso exercesse um efeito antioxidante, poderia agir nas três linhas de defesa orgânica apresentadas anteriormente.

A análise dos resultados demonstrou que no início dos experimentos o lote de fêmeas não prenhes apresentaram freqüência de micronúcleos basais semelhantes entre os diferentes grupos. Já no lote de fêmeas prenhes, os grupos G4, G5 e G6 possuíam freqüência basal aumentada apesar de não apresentarem sintoma de nenhuma patologia de base que pudesse levar ao aumento de danos no DNA. Na avaliação da mutagenicidade da fenilalanina, observou-se que esta apresentou atividade mutagênica nas duas doses testadas para o lote de fêmeas não prenhes e somente para dose mais alta no lote de fêmeas prenhes. Este fato pode sugerir que as fêmeas prenhes possuam metabolismo com maior consumo de fenilalanina e desta forma não há um grande acúmulo deste aminoácido para que o mesmo possa causar danos ao organismo como parece ter ocorrido no lote de fêmeas não prenhes.

As hiperfenilalaninemias são erros inatos do metabolismo, de herança autossômica recessiva, cujo distúrbio primário se localiza na conversão do aminoácido fenilalanina em tirosina por deficiência da enzima hepática fenilalaninahidroxilase. Em consequência disto, ocorre aumento da concentração de fenilalanina e de seus subprodutos no sangue e na urina (fenilpiruvato, fenilacetato, fenilactato e fenilacetilglutamina), com formação reduzida de tirosina. Graves danos cerebrais são acarretados pela elevação da concentração plasmática de fenilalanina no organismo, tais como a inibição competitiva do transporte de outros aminoácidos necessários para a síntese de proteínas, formação ou estabilização debilitadas de polirribossomos, síntese reduzida e degradação aumentada de mielina, bem como formação inadequada de norepinefrina e serotonina (LONGO, 2002; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2004), além destes fatos pode ainda ocorrer a formação inadequada de enzimas envolvidas na detoxificação do organismo, como é o caso das enzimas de Fase II.

A glutathiona, enzima de Fase II, envolvida nos processos de detoxificação, constitui um importante sistema de proteção endógena das células contra os prejuízos provocados por substâncias tóxicas e oxidantes endógenos produzidos pelo seu metabolismo. A glutathiona está presente em elevadas concentrações nas células dos mamíferos e demais vertebrados, sob forma reduzida (GSH), junto a

menores quantidades de forma oxidada (GSSG) (WILHELM FILHO et al., 2000). Uma queda nos níveis de glutathiona, em sua forma reduzida GSH, de 20 a 30% pode prejudicar as defesas celulares contra a ação tóxica dos radicais oxidantes levando ao dano celular e à morte (HEFFNER & REPINE,1989). Segundo MATSUBARA (1997), sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza igualmente o estresse oxidativo. Assim, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH.

Desta maneira, este fato pode auxiliar no entendimento de porque a suplementação deste aminoácido é capaz de provocar atividade mutagênica. Em contrapartida a mesma dieta enteral, quando associada a um agente quimioterápico, é capaz de reduzir os danos clastogênicos causados como efeito colateral. Sendo importante relatar que a redução deste efeito é sinônimo de melhoria da qualidade de vida de um paciente em quimioterapia.

Uma análise geral da antimutagenicidade indica atividade quimiopreventiva da fenilalanina para os dois lotes. No entanto, ela se fez de forma mais efetiva para as fêmeas prenhes. Outro fato que chama a atenção é que a suplementação da menor dose demonstra melhor atividade antimutagênica e por conseqüência melhor porcentagem de redução de danos. Faz-se ainda necessário observar que não houve uma curva dose-resposta para as doses testadas.

Desta forma, observa-se que a suplementação de menores doses não induziria uma hiperfenilalaninemia temporária e assim teriam menores efeitos clastogênicos em decorrência da suplementação. E mesmo com suplementações enterais de baixas doses este aminoácido seria capaz de exercer sua atividade antioxidante e anticlastogênica.

Frente aos resultados apresentados verifica-se que há necessidade de novos estudos sobre a suplementação de dietas enterais de fenilalanina para a prevenção de lesões de DNA, bem como para a melhoria da qualidade de vida de pacientes em quimioterapia, uma vez que apesar deste aminoácido ser capaz de reduzir os danos causados pelo quimioterápico em estudo ele também é capaz de causar aumento da freqüência de micronúcleos. Assim, recomenda-se novos estudos que testem doses menores de fenilalanina para comprovar se esta ainda continuará provocando a indução de micronúcleos ou se a mesma somente apresentará capacidade quimiopreventiva.

REFERÊNCIA

- BAISE, E.. **Avaliação da suplementação enteral com glutamina administrada simultaneamente à cisplatina na prevenção de danos que podem levar ao aumento da predisposição ao câncer.** 2006. 55f. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) – Departamento de Nutrição, Centro Universitário Filadélfia, Londrina.
- BORGES, V.C.. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: WAITZBERG, D.L.. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica.** São Paulo: Atheneu, 2001, cap. 96, p. 1495-1509.
- CAMPBELL, M.K.. **Bioquímica.** Porto Alegre: Artmed; 2006, 752p.
- DEGÁSPARI, C. H; WASZCZYNSKYJ, N.. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica.**, v. 5, p. 33-40, 2004.
- FERRARI, C.K.B. & TORRES, E.A.F.S.. New dietetic compounds with anticarcinogenic properties. **Rev. Bras. Canc.**, v. 48, p. 375-382, 2002.
- FERRARI, I.. Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. In: RABELLO-GAY, M.N; RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-NETO, R.. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/ Revista Brasileira, 1991, p.107-112.
- FERREIRA, L.M.K.. **Avaliação de dieta enteral à base de glutamina na prevenção de danos genotóxicos que podem se relacionar ao desenvolvimento do câncer.** 2006. 50f. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) – Departamento de Nutrição, Centro Universitário Filadélfia, Londrina.
- FIGUEIRÓ-FILHO, E.A.; LOPES, A.H.A.; SENE FONTE, F.R.A.; SOUZA-JÚNIOR, V.G.; BOTELHO, C.A.; DUARTE, G.. Fenilcetonúria materna: relato de caso. **Rev.Bras. Ginec. Obst.**, v.26, p. 813-817, 2004.
- FLAGG, E.W.; COATES, R.J.; GREENBERG, R.S.. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 14, p. 419-427, 1995.
- HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y., SOFUNI, T.; ISHIDATE Jr., M.. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Res.**, v. 245, p. 245-249, 1990.
- HEFFNER, J.E & REPINE, J.E. Pulmonary strategies of antioxidant defense. **Amer. Rev. Resp. Dis.**, v.140, p.531-554, 1989.

KELLOFF, G.J.; CROWELL, J.A.; STEELE, V.E.; LUBET, R.A.; BOONE, C.W.; MALONE, W.A.; HAW, E.T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCE, J.A.; KOPELOVICH, L.; ALI, T.; VINER, J.L.; SIGMAN, C.C.. Progress in cancer chemoprevention. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 889, p. 1-13, 1999.

KLEINER, S.M.. **Defense plants: foods that fight disease.** 28 set. 1997. Disponível em: <<http://www.physsportsmed.com>>. Acesso em: 28 set. 1998.

MAXWELL, S.R.J.. Prospects for the use antioxidant therapies. **Drugs.**, v. 49, p. 345-61, 1995.

KONG, Q.; LILLEHEI, K.O.. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. **Med. Hypotheses.**, v.51, p.405-409, 1998.

MATSUBARA, L.S Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.43, p.61-68, 1997.

MILNER, J.A.. Functional foods and health promotion. **J. Nutr.**, v. 129, p. 1395-1397, 1999.

LONGO N. **Distúrbios hereditários do metabolismo e do armazenamento de aminoácidos.** In: BRAUNWALD, E.; FAUCI, A.S.; KASPER, D.L., HAUSER, S.L.; LONGO, D.L.; JAMESON, J.L.. EDITORS. Harrison Medicina Interna. 15ª ed. Rio de Janeiro: MCGraw Hill; 2002. p.2450-1.

MORA, L.O.; ANTUNES, L.M.G.; FRANCESCATO, H.D.C.; BIANCHI, M.L.P.. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and nephrotoxicity in rats. **Pharmacol Res.**, v. 47, p.517-522, 2003.

SANTOS, H.S. & CRUZ, W.M.S.. The antioxidant vitamin nutritional therapy and the chemotherapy treatment in oncology. **Rev. Bras. Canc.**, v. 47, p. 303-308, 2001.

SIES, H.. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, p. 213-219, 1999.

SASSAKI, E.S.. **Influência da dieta enteral, em pré-tratamento com glutamina, na prevenção de danos genéticos que podem aumentar a predisposição ao desenvolvimento do câncer.** 2006. 57f. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) – Departamento de Nutrição, Centro Universitário Filadélfia, Londrina.

VICENTINI, A.P. **Avaliação dos efeitos de dieta enteral à base de glutamina na prevenção de danos clastogênicos que podem levar ao desenvolvimento de câncer.** 2006. 52f. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) – Departamento de Nutrição, Centro Universitário Filadélfia, Londrina.

WEISBURGER, J.H.. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. **Food Chem. Toxicol.**, v. 37, p. 943-948, 1999.

WEISBURGER, J.H.. Eat to live, not live to eat. **Nutrition**, v. 16, p. 767-773, 2000.

WILHELM FILHO, D. et al. Comparative antioxidant defences in vertebrates- emphasis on fish and mammals trends. **Comp. Biochem. Physiol.** v.7, p.33-45, 2000.

ZHANG, S.; HUNTER, D.J.; FORMAN, M.R.; ROSNER, B.A.; SPEIZER, F.E.; COLDITZ, G.A.; MANSON, J.E.; HANKISON, S.E.; WILLETT, W.C.. Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 91, p. 547-556, 1999.

Tabela 1 - Frequência, média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos referentes ao ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos fêmeas não grávidas em tratamento agudo:

Tratamento	Frequência de Micronúcleos			Média ± Desvio Padrão			%RD	
	T0	T24	T48	T0	T24	T48	T24	T48
Grupo 1	21	12	15	3,00±1,69	1,71±0,88	2,14±0,83	-	-
Grupo 2	29	129	189	4,14±2,23 ^a	18,43±2,06 ^{a*}	27,00±6,19 ^{a*}	-	-
Clastogenicidade								
Grupo 3	30	65	65	4,29±1,89 ^a	9,29±1,80 ^{a*}	9,29±1,98 ^{a*}	-	-
Grupo 4	31	107	97	4,43±1,72 ^a	15,28±2,56 ^{a*}	13,86±2,73 ^{a*}	-	-
Anticlastogenicidade								
Grupo 5	25	62	138	3,57±2,30 ^b	8,86±1,46 ^{b*}	19,71±2,93 ^{b*}	57,24	29,32
Grupo 6	33	92	147	4,71±1,70 ^b	13,14±2,19 ^{b*}	21,00±2,31 ^{b*}	31,64	24,13

Legenda: Grupo 1 – Solução Tampão Fosfato; Grupo 2 – Ciclofosfamida (35mg/Kg, p.c. – i.p.); Grupo 3 – Fenilalanina (150mg/Kg, p.c. – v.o.); Grupo 4 – Fenilalanina (300mg/Kg p.c. – v.o.); Grupo 5 - Ciclofosfamida (35mg/Kg, p.c. – i.p.) + Fenilalanina (150mg/Kg, p.c. – v.o.); Grupo 6 - Ciclofosfamida (35mg/Kg, p.c. – i.p.) + Fenilalanina (300mg/Kg, p.c. – v.o.). T0 – coleta de sangue periférico realizada antes da administração de drogas; T24 – coleta de sangue periférico realizada após 24h da primeira administração; T48 – coleta de sangue periférico realizada após 48h da primeira administração. ^aComparado com Grupo 1; ^bComparado com Grupo 2; *Diferença estatisticamente significativa (Teste Estatístico – t-Student – p<0,05).

Tabela 2 - Frequência, média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos referentes ao ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos fêmeas grávidas em tratamento agudo:

Tratamento	Frequência de Micronúcleos			Média ± Desvio Padrão			%RD	
	T0	T24	T48	T0	T24	T48	T24	T48
Grupo 1	14	17	9	2,00±1,63	2,43±1,99	1,29±0,95	-	-
Grupo 2	15	158	266	2,14±1,07 ^a	22,57±4,39 ^{a*}	38,00±3,51 ^{a*}	-	-
Clastogenicidade								
Grupo 3	22	34	45	3,14±1,57 ^a	4,86±2,27 ^a	6,43±2,22 ^{a*}	-	-
Grupo 4	46	84	69	6,57±1,62 ^{b*}	12,00±1,91 ^{a*}	9,86±1,57 ^{a*}	-	-
Anticlastogenicidade								
Grupo 5	30	97	152	4,29±1,50 ^{b*}	13,86±5,24 ^{b*}	21,71±6,42 ^{b*}	43,25	44,37
Grupo 6	35	132	169	5,00±1,91 ^{b*}	18,85±1,68 ^b	24,14±2,54 ^{b*}	18,47	37,76

Legenda: Grupo 1 – Solução Tampão Fosfato; Grupo 2 – Ciclofosfamida (35mg/Kg, p.c. – i.p.); Grupo 3 – Fenilalanina (150mg/Kg, p.c. – v.o.); Grupo 4 – Fenilalanina (300mg/Kg p.c. – v.o.); Grupo 5 - Ciclofosfamida (35mg/Kg, p.c. – i.p.) + Fenilalanina (150mg/Kg, p.c. – v.o.); Grupo 6 - Ciclofosfamida (35mg/Kg, p.c. – i.p.) + Fenilalanina (300mg/Kg, p.c. – v.o.). T0 – coleta de sangue periférico realizada antes da administração de drogas; T24 – coleta de sangue periférico realizada após 24h da primeira administração; T48 – coleta de sangue periférico realizada após 48h da primeira administração.
^aComparado com Grupo 1; ^bComparado com Grupo 2; *Diferença estatisticamente significativa (Teste Estatístico – t-Student – p<0,05).