UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Rosana Ferrari

**Efeitos da administração de ácido indol-3-acético (AIA)
sobre parâmetros metabólicos e eletroencefálicos de ratos.**

Pirassununga

2008

Rosana Ferrari

**Efeitos da administração de ácido indol-3-acético (AIA)
sobre parâmetros metabólicos e eletroencefálicos de ratos.**

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

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Ernane Jose Costa Xavier

Co-orientador: Profa. Dra. Mariza Pires de Melo

Pirassununga

2008

“Ele (O SÁBIO) não se ausenta de si mesmo, ele não se abandona, só ele pode se recolher em si próprio, ele se torna constantemente o seu próprio espelho; ele se abraça a si mesmo, ele se volta para si, circularmente... Ele mora ao mesmo tempo no mundo sensível e no mundo intelectual. Pelo seu corpo, é verdade, ele vive sobre a Terra, como as feras, mas por seu espírito, que se abre aos céus, ele percorre caminhos celestes.”

(Charles de Bovelles)

AGRADECIMENTOS

À DEUS, que na minha vida É PRINCÍPIO, MEIO E FIM”.

À minha, mãe Maria Therezinha Bianchetti Ferrai, pelo significado de sua vida na minha.

Ao Renato, porque sem o seu amor eu seria menor. Pela minha ausência durante o período de realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Ernane José Xavier Costa que nunca mediu esforços para me ensinar. Pela amizade, carinho e paciência em compartilhar comigo seus conhecimentos.

À Profa. Dra. Mariza Pires de Melo, que me acolheu com carinho em seu laboratório e depositou em mim confiança. Que sempre esteve presente e dividiu comigo os momentos difíceis. Sem o seu incentivo e apoio constantes, eu não teria chegado até aqui.

Aos especialistas de laboratório Aldo Ivan Céspedes Arce e Silvana M. Piccoli Pugine, que sempre estiveram dispostos para ajudar. Pela amizade e pelo auxílio técnico prestado

Aos amigos do LAFAC e do Laboratório de Química Biológica que contribuíram efetivamente no desenvolvimento deste trabalho: Ana Carolina, Dimas, Fabrício, Lívia, Max e Tatiane.

Aos Professores Dr. Andrés Vercik e Dr. Cláudio Alexandre Gobatto, pelas valiosas correções que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rogério Lacaz, que me fez refletir sobre a diferença entre “estar vivo” e “ser vivo”.

Ao amigo Rogério Bernardo, que sempre me fez acreditar que era possível !!

A todos os colegas do LAFAC e do Laboratório de Química Biológica que compartilharam sua amizade comigo durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus queridos alunos, que mesmo no anonimato, são um incentivo constante na minha vida acadêmica!

À FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

FERRARI, R. **Efeitos da administração de ácido indol-3-acético (AIA) sobre parâmetros metabólicos e eletroencefálicos de ratos.** 2008. 107f. Tese (doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

O ácido indol-3-acético (AIA) é um produto do metabolismo do triptofano encontrado nos organismos animais, vegetais e em microrganismos. Destacam-se os trabalhos que atribuíram ao AIA efeitos tanto antioxidantes quanto oxidantes em diferentes sistemas biológicos. O objetivo do presente estudo foi o de avaliar os efeitos da administração do AIA no metabolismo muscular e cerebral e na atividade elétrica cerebral de ratos. Foram realizados dois grupos de experimentos. No primeiro grupo foram avaliados os seguintes parâmetros: taxa glicêmica e o ganho de peso corporal de animais tratados por 14 dias com AIA (40 mg/Kg de peso vivo, via intragástrica); atividade das enzimas antioxidantes glutatona redutase (GR), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e das enzimas do metabolismo da glicose hexoquinase (HK), lactato desidrogenase (LDH) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) nos músculos sóleo e gastrocnêmio e a atividade das enzimas antioxidantes GR, CAT e SOD e a quantificação dos produtos resultantes da peroxidação lipídica (TBARs) no cérebro de ratos tratados por 14 dias com diferentes doses de AIA (1, 18 e 40 mg/Kg de peso animal, via intragástrica). Os respectivos controles de todas essas análises foram obtidos de ratos que receberam 1 mL de tampão fosfato pH 7,4 via intragástrica sob as mesmas condições experimentais. No segundo grupo de experimentos foi obtido o eletroencefalograma (EEG) dos animais. O EEG obtido foi filtrado nas bandas de frequências delta (0,3-4 Hz), teta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (12-30 Hz) e em cada banda calculou-se a energia do sinal. Foram avaliados o EEG de animais tratados com AIA (40 mg/Kg de peso vivo) e tratados com triptofano (40 mg/Kg de peso animal), ambos por via intragástrica. Os controles para esses tratamentos foram o EEG coletado 1 hora antes e 1 hora depois da administração de 1mL de tampão fosfato por via intragástrica no mesmo animal que recebeu o tratamento. Os resultados foram analisados por ANOVA com significância de 0,05 usando o teste de Tukey e os estimadores foram validados usando-se *bootstrap*. A administração de AIA (40mg/Kg de peso vivo) não alterou a taxa glicêmica e evolução de peso corporal dos animais, em relação ao controle. Não foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos de amostras de animais tratados com AIA (todas as doses) em relação aos respectivos controles para: atividade das enzimas antioxidantes muscular e cerebral; enzimas envolvidas com o metabolismo da glicose muscular; conteúdo de peroxidação lipídica (TBARs) cerebral. O método não invasivo de aquisição de EEG desenvolvido para ratos permitiu adquirir e analisar o sinal elétrico cerebral. Não foram observadas alterações no padrão do EEG após a administração de tampão fosfato. No entanto, o AIA na dose de 40 mg/Kg de peso vivo alterou o padrão do EEG do animal, pois, a energia das frequências de ondas alfa (8-12 Hz) e beta (12-30 Hz) foi maior em relação ao estado normal e após administração de tampão fosfato. Já o triptofano na dose de

40 mg/Kg de peso vivo aumentou a energia da onda delta (0,3-4 Hz) e diminuiu na energia da onda beta (12-30 Hz) em relação ao estado normal. O método não invasivo de EEG para rato desenvolvido neste trabalho foi sensível para detectar a atividade elétrica encefálica dos animais e o triptofano serviu como parâmetro de referência, pois promoveu diferentes alterações no padrão do EEG daquelas observadas nos animais tratados com AIA. Conclui-se que o AIA não interferiu nos parâmetros metabólicos oxidativos e energéticos dos músculos e do cérebro dos animais estudados, mas promoveu alterações fisiológicas que desencadearam as mudanças observadas na energia do sinal de EEG dos animais.

Palavras-chave: AIA; metabolismo celular; enzimas antioxidantes; eletroencefalograma.

ABSTRACT

FERRARI, R. **Effects of indole-3-acetic acid (IAA) administration on metabolism parameters and electro encephalic on rats.** 2008 107f. Thesis (Doctorate) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

Indole-3-acetic acid (IAA) is a tryptophan metabolic found in animals organisms, microorganisms and vegetables. It is remarkable the work done to IAA antioxidants and prooxidants effects in several biological systems. The main purpose of these studies was to evaluate the effects of intragastric IAA administration in brain and in muscle metabolism and electrical brain activities in rat. The experiments were done in two groups. The first one, were evaluated the following parameters: glycemic rate and corporal gain weight to those animals treated 14 days with IAA (40 mg/Kg of body weight); activity of antioxidants enzymes as glutathione reductase (GR), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD); activities of hexokinase (HK), lactate dehydrogenase (LDH) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) on soleus and gastrocnemius muscle; antioxidants enzymes activities and level of tiobarbituric reactivities substances (TBARs) in brain from rats treated during 14 days with doses of IAA (1, 18 and 40 Kg/kg body of weight). All those analyses controls were obtained from rat that was given 1 mL of phosphate buffered saline, pH 7 (PBS), under the same experiments conditions as the group treated with IAA. On the second group of experiments was evaluated EEG pattern obtained from fixed electrodes on the animal skin surface were not sedated, and shown at delta frequency (0.3-4 Hz), theta (4-8 Hz), alpha (8-12 Hz) and beta (12-30 Hz) and the energy of those band frequency was calculated using a developed algorithm software MATLAB®. EEG was evaluated from animals treated with IAA (40 mg/Kg body weight) and treated with tryptophan (40 mg/Kg body weight), both intragastric. The management control for those treatments were EEG collected 1 hour before and 1 hour after the intragastric administration of 1mL PBS at the same animal that received the treatment. The results were analysed by ANOVA with great significance of 0.05 using the Tukey test and were evaluated by bootstrap. The IAA administration (40 mg/Kg body weight) did not change the glycaemia rate and the animal weight evolution, to compare with the control. Were not observed any significant differences among results from animals treated with IAA (all doses) relating to respective controls to: a) brain and muscles antioxidants enzymes activity; b) activities of enzymes with muscular glucose metabolism; c) brain lipid peroxidation contents by TBARs level. No invasive EEG collecting methods developed for rat allowed to collect and analyse electric brain signal. After an administration of PBS, were not observed any changes at EEG pattern. IAA dose of 40 mg/Kg body weight did change the animal EEG standard, the frequency energy of alpha wave to (8-12 Hz) and beta (12-30 Hz) was higher then normal after administration of PBS. On the other side, tryptophan dose of 40 mg/Kg body weight increased the delta wave energy to (0,3-4 Hz) and decreased the beta wave energy to (12-30 Hz), to compare with the normal standard. Non invasion EEG collecting methods for rat developed in this studies was sensible in order to detect an animals electric encephalic activity and the tryptophan became as

reference parameter, due to several changes on pattern EEG to those animals treated with IAA. Concluding that, IAA did not interfere on oxidative metabolic parameters, neither to the brain and muscles of the studied animals, but promoted physiological changes that was possible to observe on animals electroencephalogram.

Key words: IAA; cellular metabolism; antioxidant enzymes; electroencephalogram.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Biossíntese do ácido indol-3-acético a partir do aminoácido triptofano. Adaptado de MOURÃO et al. (2008).....	21
Figura 2 - Metabolismo da Glicose (MOTTA, 2005).....	26
Figura 3 - Representação esquemática da eliminação de hidroperóxidos através das enzimas Glutathione peroxidase (GPx) e Glutathione reductase (GR) agindo sobre o substrato glutathione.....	31
Figura 4 - Localização de eletrodos para coleta de EEG implantados no crânio de rato (LAPRAY et al., 2008).....	41
Figura 5 - Representação da interface de captação do sinal de elétrico cerebral de ratos por método não invasivo para EEG. (A) Eletrodo desenvolvido a partir da junção de uma cânula guia acoplada a um eletrodo de agulha. (B) O sistema foi colado na superfície da pele da cabeça do animal após tricotomia. (C) Posições de captação usadas para coleta do EEG.....	57
Figura 6 - Registro de EEG adquirido de um rato sem qualquer tratamento (controle). Amostragem a 120Hz.....	69
Figura 7 - Densidade espectral de potência para o trecho de 3s de EEG de um rato que não recebeu tratamento (condição normal). Espectro calculado usando o método de Welch com superposição de 50%. O resultado é mostrado com intervalo de confiança de 95% (linha central).....	71
Figura 8 - Gráfico do sinal de EEG de 3s referente ao intervalo (1500:1860) obtido do registro apresentado na Figura 6.....	72

Figura 9 - Decomposição de um trecho de 3 segundos de EEG nas faixas alfa, beta, delta e teta obtido de um rato na situação normal (sem tratamento).....	72
Figura 10 - Dispersão dos valores da média da energia da banda de frequência alfa reamostradas 1000 vezes no <i>bootstrap</i> . EEG adquirido por uma hora após a administração de PBS e AIA (40 mg/Kg de peso vivo) sucessivamente.....	75
Figura 11 - Dispersão dos valores da média da energia da banda de frequência beta reamostradas 1000 vezes no <i>bootstrap</i> . EEG adquirido por uma hora após a administração de PBS e AIA (40 mg/Kg de peso vivo) sucessivamente.....	76
Figura 12 - Dispersão dos valores da média da energia da banda de frequência delta reamostradas 1000 vezes no <i>bootstrap</i> . EEG adquirido por uma hora após a administração de PBS e Triptofano (40 mg/Kg de peso vivo) sucessivamente.....	78
Figura 13 - Dispersão dos valores da média da energia da banda de frequência teta reamostradas 1000 vezes no <i>bootstrap</i> . EEG adquirido por uma hora após a administração de PBS e Triptofano (40 mg/Kg de peso vivo) sucessivamente.....	79
Figura 14 - Dispersão dos valores da média da energia da banda de frequência beta reamostradas 1000 vezes no <i>bootstrap</i> . EEG adquirido por uma hora após a administração de PBS e Triptofano (40 mg/Kg de peso vivo) sucessivamente.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de Glicose plasmática dos ratos em jejum de 12 horas sob condições controle (receberam 1 mL de tampão fosfato pH7,4 intragástrica) no ponto 0 (zero) minutos e 180 minutos após o tratamento.....	61
Tabela 2 - Concentração de glicose plasmática dos ratos em jejum de 12 horas tratados com AIA (receberam 40mg/Kg de peso vivo via intragástrica) no ponto 0 (zero) minutos e 180 minutos após tratamento.....	61
Tabela 3 – Avaliação da evolução de peso dos ratos dos grupos controle e tratados com AIA (T3 - 40 mg/Kg de peso vivo via intragástrica), pesados no 1 ^o , 7 ^o e 14 ^o dia de tratamento.....	62
Tabela 4 – Atividade específica das enzimas glutathione redutase (GR), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) avaliada no músculo sóleo dos ratos nos grupos controle (receberam 1 mL de tampão fosfato pH7,4 intragástrica) e tratados com AIA por via intragástrica nas doses de 1 (T1), 18 (T2) e 40 (T3) mg/Kg de peso vivo.....	63
Tabela 5 – Atividade específica das enzimas glutathione redutase (GR), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) avaliada no músculo gastrocnêmio dos ratos nos grupos controle (receberam 1 mL de tampão fosfato pH7,4 intragástrica) e tratados com AIA por via intragástrica nas doses de 1 (T1), 18 (T2) e 40 (T3) mg/Kg de peso vivo.....	64
Tabela 6 – Atividade específica das enzimas glutathione redutase (GR), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) avaliada no cérebro dos ratos nos grupos controle (receberam 1 mL de tampão fosfato pH7,4 intragástrica) e tratados com AIA por via intragástrica nas doses de 1 (T1), 18 (T2) e 40 (T3) mg/Kg de peso vivo.....	65

Tabela 7 – Atividade específica das enzimas hexoquinase (HQ), lactato desidrogenase (LDH) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) avaliada no músculo sóleo dos ratos nos grupos controle (receberam 1 mL de tampão fosfato pH7,4 intragástrica) e tratados com AIA por via intragástrica nas doses de 1 (T1), 18 (T2) e 40 (T3) mg/Kg de peso vivo.....	66
Tabela 8 – Atividade específica das enzimas hexoquinase (HQ), lactato desidrogenase (LDH) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) avaliada no músculo gastrocnêmio dos ratos nos grupos controle (receberam 1 mL de tampão fosfato pH7,4 intragástrica) e tratados com AIA por via intragástrica nas doses de 1 (T1), 18 (T2) e 40 (T3) mg/Kg de peso vivo.....	67
Tabela 9 – Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) no cérebro dos ratos nos grupos controle (receberam 1 mL de tampão fosfato pH7,4 intragástrica) e tratados com AIA por via intragástrica nas doses de 1 (T1), 18 (T2) e 40 (T3) mg/Kg de peso vivo.....	68
Tabela 10 – Energia do sinal de trechos de 3 segundos de EEG livres de artefato filtrados nas bandas de frequências delta (0,3-4 Hz), teta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (12-30 Hz) na condição anterior (normal) e posterior aos tratamentos (tampão fosfato-PBS; AIA - 40 mg/Kg de peso vivo).....	73
Tabela 11 – Energia do sinal de trechos de 3 segundos de EEG livres de artefato filtrados nas bandas de frequências delta (0,3-4 Hz), teta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (12-30 Hz), na condição anterior (normal) e posterior aos tratamentos (tampão fosfato-PBS; triptofano - 40 mg/Kg de peso vivo).....	77

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Ácido indol-3-acético	20
2.2 Metabolismo celular e o estresse oxidativo	25
2.2.1 O músculo esquelético.....	35
2.2.2 Os neurônios e a atividade elétrica cerebral.....	37
2.3 O EEG em ratos.....	39
2.4 Processamento de sinais digitais.....	43
3 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivos específicos	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1 Reagentes	47
4.2 Preparo do ácido indol-3-acético (AIA).....	47
4.3 Animais experimentais	47
4.4 Delineamentos experimentais	48
4.4.1 Experimentos para determinação da atividade enzimática	48
4.4.1.1 Extração de enzimas dos tecidos	50
4.4.1.2 Atividade específica da glutathione redutase (GR)	50
4.4.1.3 Atividade específica da catalase (CAT).....	51
4.4.1.4 Atividade específica da superóxido dismutase (SOD).....	51.

4.4.1.5 Atividade específica da hexoquinase (HQ).....	52
4.4.1.6 Atividade específica da lactato desidrogenase (LDH).....	53
4.4.1.7 Atividade máxima da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).....	53
4.4.2 Avaliação da peroxidação lipídica.....	54
4.4.3 Determinação de proteínas totais nas amostras.....	55
4.4.4 Experimentos para determinar o eletroencefalograma dos animais.....	55
4.4.5 Análise Estatística dos Resultados	59
5 RESULTADOS	60
5.1 Taxa glicêmica e peso corporal.....	60
5.2 Parâmetros bioquímicos.....	62
5.2.1 Enzimas antioxidantes nos músculos.....	63
5.2.2 Enzimas antioxidantes no cérebro	64
5.2.3 Enzimas do metabolismo da glicose	65
5.2.4 Peroxidação lipídica	67
5.3 Perfil eletroencefalográfico (EEG)	68
6 DISCUSSÃO.....	81
7 CONCLUSÕES.....	89
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXO 1 - Parecer da Comissão de Ética Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, referente ao projeto envolvendo ratos e iniciado em 2005 na FZEA.....	103
ANEXO 2 - Algoritmo desenvolvido no software MATLAB® para o processamento de EEG de ratos adquiridos por método não invasivo desenvolvido no presente trabalho.....	205

ANEXO 3 - Algoritmo desenvolvido no software MATLAB® para o teste de <i>bootstrap</i> do EEG de ratos adquiridos por método não invasivo desenvolvido no presente trabalho.....	107
---	-----

1 INTRODUÇÃO

As células são unidades morfo-funcionais com capacidade de se adaptarem a um variado número de situações, pois respondem aos diferentes estímulos alterando seu metabolismo tanto em intensidade quanto em frequência, além de acionar mecanismos intrínsecos de proteção.

Para as células animais se manterem vivas é fundamental a produção de energia. Substratos energéticos, como a glicose, são convertidos em produtos que liberam energia sendo o principal deles o ATP. Entre as enzimas que participam desses processos bioquímicos encontram-se a hexoquinase e lactato desidrogenase que podem ser utilizadas como parâmetros para avaliar o metabolismo da glicose a partir da quantificação da atividade enzimática específica.

Outra enzima, a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) participa da via das pentoses para gerar a ribose e o NADPH que é utilizado, dentre outras, em reações antioxidantes. Neste sentido, a quantificação da atividade da G6PDH permite avaliar o estresse oxidativo no sistema biológico.

As fibras musculares esqueléticas apresentam um exemplo notável da capacidade de adaptação metabólica celular, pois alteram o seu metabolismo, de oxidativo para glicolítico, quando há aumento na demanda funcional e no consumo de energia de baixo suprimento de gás oxigênio. Outros tipos celulares, como os neurônios, não resistem a períodos prolongados nessas condições.

Durante os processos metabólicos são gerados também produtos tóxicos que podem danificar as estruturas celulares. O principal evento que desencadeia a formação de agentes lesivos nas células é o estresse oxidativo. O estresse oxidativo

é gerado quando ocorre um desbalanço entre o sistema de geração e de neutralização dos produtos do metabolismo oxidativo e assim, esses produtos que são tóxicos e lesivos exercem ações sobre as estruturas celulares como a membrana plasmática e o DNA e promovem a morte celular.

Coletivamente, os produtos gerados do metabolismo oxidativo são chamados de espécie reativas do oxigênio (EROs) e inclui espécies radicalares – os radicais livres. Os agentes que neutralizam esses produtos são chamados de antioxidantes.

Entre os sistemas de defesa celular antioxidante estão enzimas como a glutathione redutase (GR), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Essas enzimas podem ter sua atividade aumentada quando na presença de agentes que promovem aumento na formação de EROs. A quantificação dessas enzimas, bem como dos produtos gerados da peroxidação lipídica (TBARs), tem sido utilizada para avaliar o efeito antioxidante de diferentes tipos de substâncias sobre os sistemas biológicos. Dentre esses, o AIA, um produto do metabolismo do triptofano, tem demonstrado efeitos tanto antioxidantes como prooxidantes, quando em diferentes sistemas biológicos.

No Sistema Nervoso Central, as substâncias antioxidantes podem prevenir o envelhecimento e morte de neurônios, células com limitada capacidade de divisão e que estão envolvidas no controle do funcionamento dos demais sistemas biológicos dos animais. O uso de métodos de monitoramento da atividade elétrica cerebral, como a eletroencefalografia, possibilita a análise em tempo real de processos neurofisiológicos que estão ocorrendo após algum estímulo.

No tocante à Zootecnia, é importante a investigação de produtos que possam contribuir na produtividade e qualidade de animais como as substâncias com potencial antioxidante que melhoram a resistência ao estresse oxidativo em

sistemas vitais, como o cérebro e em músculos esqueléticos que são o principal produto de comercialização.

Nesse trabalho estão apresentados os resultados obtidos de experimentos realizados em ratos Wistar machos que serviram como modelo experimental para investigar os efeitos do tratamento com AIA sobre as atividades de enzimas do metabolismo da glicose em músculos esqueléticos e enzimas antioxidantes nesses músculos e no cérebro e sobre o perfil de EEG. Um método não invasivo de captação de EEG para ratos foi desenvolvido nesse trabalho e permitiu avaliar os efeitos do AIA no perfil do sinal elétrico adquirido após a aplicação de técnicas de processamento de sinal digital.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ácido indol-3-acético

O ácido indol-3-acético (AIA) é um metabólito do aminoácido triptofano produzido nas células vegetais, nos animais, inclusive no homem e em alguns microrganismos como bactérias e fungos (GORDON; BARR; FRY, 1972; MILLS; FINLAY; HADDAD, 1991). O AIA está classificado como um hormônio vegetal pertencente ao grupo das auxinas.

Nos vegetais, o AIA é largamente distribuído nos brotos, folhas jovens, flores e frutos (GORDON, BARR, FRY, 1972). Como auxina, o AIA realiza função regulatória nos processos de divisão, alongação e diferenciação celular (OLSSON et al., 1998) e parece também influenciar processos de dominância apical, floração em bromeliáceas e tropismo de brotos e raízes em resposta à gravidade e à luz (VÁLIO, 1986; DAVIES, 1988).

A biossíntese do AIA a partir do triptofano é esquematizado na Figura 1. A descarboxilação do triptofano produz triptamina que, pela ação da enzima monoamina-oxidase (MAO), produz indol-3-acetaldeído que é convertido em ácido indol-3-acético pela ação de desidrogenase aldeídica (MILLS; FINLAY; HADDAD, 1991). Nos vegetais, o catabolismo do AIA envolve processos oxidativos e as peroxidases são as principais enzimas envolvidas nesses processos (CAMPA, 1991).

Figura 1 - Biossíntese do ácido indol-3-acético a partir do aminoácido triptofano. Adaptado de MOURÃO et al. (2008).

A presença de AIA nos animais pode ser decorrente, além da síntese a partir do triptofano em diferentes tecidos (GORDON, BARR E FRY, 1972), da absorção intestinal via produção bacteriana ou absorção intestinal a partir de alimentos ricos em AIA, como os vegetais ou derivados fermentados do leite ou da uva (WEISSABACH et al., 1959; MARTINEZ et al., 1993; FERREIRA et al., 2006). O AIA é o principal produto de degradação metabólica do triptofano pelas bactérias presentes no rumem (MOHAMMED et al., 2003)

WEISSABACH et al. (1959) verificaram que a concentração de AIA nos tecidos e fluídos de ratos e camundongos é proporcional a dieta rica em triptofano e dependente também da ação das bactérias intestinais.

O ácido indol-3-acético foi identificado na urina humana (KOGL et al., 1933), no líquido cefalorraquidiano (BERTILSSON; OALMER, 1972), no plasma sanguíneo (MARTINEZ et al., 1993), e em diversos tecidos como os de pulmão, rim, fígado e cérebro (MIRSKY; DIENGOTT, 1956; TUSELL et al., 1984). Sabe-se que em diferentes tipos de patologias ocorre aumento na concentração de AIA na urina, provavelmente decorrente de modificações no metabolismo do triptofano. Nesse sentido, encontram-se os casos de pacientes que apresentaram fenilcetonúria (ARMSTRONG; ROBINSON, 1954), doença de Hartnup (JEPSON, 1959), doença de “maple syrup” (MACKENZIE; WOOLF, 1959). Também são citados casos de diabetes e disfunções musculares (WEISSBACH et al., 1959), câncer gástrico (KABORI et al., 1983) e depressão mental (ANDERSON et al., 1984).

A administração intravenosa de AIA na dose de 50 mg/Kg de massa do animal mostra uma resposta hipoglicêmica aguda em 5 minutos (FULLER et al., 1971; SULLIVAN; STRONG, 1958). A administração de AIA nesta dose, ou maior, causa também irritabilidade, fraqueza nas patas e miotonia (FULLER et al., 1971), lassitude e imobilidade, má formação de fetos (JOHN et al., 1979) e aumento do número de fibroblastos (SINNA, 1983). Esses achados tornaram os trabalhos que investigam os possíveis efeitos produzidos pelo AIA de grande importância principalmente na busca de novas ferramentas terapêuticas.

Salles (1989) usou água de coco, que é rica em AIA, como meio diluente e preservativo de sêmen caprino e atribuiu ao AIA o aumento na motilidade dos espermatozóides e vigor espermático. O AIA também apresentou ação benéfica na conservação de espermatozóides canino, aumentou a motilidade dos espermatozóides e promoveu o conseqüente incremento da fertilidade (UCHOA et al., 2002). Para Toniolli et al. (1998) os resultados positivos do AIA na preservação

do sêmem suíno deve ser provavelmente decorrente de sua ação antioxidante, também observada em outros compostos indólicos como a melatonina (CANO; ALCARAZ; ARNAO, 2003; CELIK; TULUCE, 2006).

Jones, Abdalla e Freitas (1995) verificaram que o AIA apresentou ação antiinflamatória local quando administrado topicamente no edema de orelha induzido por óleo de cróton e pelo ácido aracdônico, semelhante ao observado com uso de indometacina.

Andrade et al. (2005) observaram que o AIA promoveu crescimento, dose-dependente, de folículo pré-antrais de ovinos, sendo que a dose de 40 ng/mL administrada no meio de cultivo promoveu ativação e crescimento folicular após dois dias. Essa concentração de AIA é a mesma encontrada na água de coco (DUA; CHANDRA, 1993). As concentrações de 500 ng/mL e 1000 ng/mL de AIA promoveram redução da porcentagem de folículos normais cultivados por apenas dois dias (ANDRADE et al., 2005). Esses dados mostram que doses elevadas de AIA podem desencadear efeito contrário ao observado com doses menores no modelo experimental utilizado.

O AIA induz efeitos protetores antioxidantes mas também efeitos prooxidantes em diferentes sistemas biológicos. Quando na presença de peroxidase, tanto endógena quanto exógena ao sistema de estudo, o AIA atua como um prooxidante. Esse efeito pode ser constatado devido ao aumento da formação das espécies reativas de oxigênio (CANDEIAS et al., 1994; CANDEIAS et al., 1997; ESCOBAR et al., 1992), pela sua citotoxicidade em neutrófilos e macrófagos (DE MELO et al., 1997; 1998 e 2004; FOLKES; WARDMAN, 2001), pela indução da peroxidação lipídica e lesões em ácidos nucleicos (FOLKES et al., 1999). Oliveira et al. (2007) não observaram ação prooxidante do AIA no fígado de ratos, órgão não portador de

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

O estresse oxidativo causado pelo sistema AIA-peroxidase compõe a base dos estudos e emprego deste sistema na terapia do câncer (“enzyme/produg”) (GRECO et al., 2000) e da proposta de aumento da atividade microbicida por neutrófilos e macrófagos em cultura (DE MELO et al., 1998).

Lins et al. (2006) verificaram que em neutrófilos de ratos recrutados após tratamento por 14 dias com AIA, não houve alteração na quantidade de H_2O_2 por essas células. Também, os autores observaram que a atividade fagocitária dos neutrófilos por partículas de Zymosan aumentou no grupo tratado com AIA. Quando o AIA foi incubado com bactérias (*Staphylococcus aureus*), a capacidade fagocitária de neutrófilos não foi alterada (BRITO, 2006).

Para Brito (2006), o AIA poderá ser aplicado em animais sem causar danos celulares, pois a administração de diferentes doses de AIA por via subcutânea (1, 18 e 40 mg/Kg de massa corporal) não alterou a integridade dos neutrófilos. Contudo, De Melo et al. (2004) verificaram em estudos *in vitro* que neutrófilos de ratos incubados por 12 horas com 1 mmol/L de AIA apresentaram a integridade da membrana diminuída, fragmentação de DNA, condensação de cromatina e despolarização da membrana mitocondrial.

Mourão (2008) observou que o AIA nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg de peso vivo preveniu o fígado de camundongos contra o estresse oxidativo causado pelo *N*-nitrosodietilamina (DEN). Nesse trabalho os autores reportaram pela primeira vez a ação antioxidante do AIA *in vivo*.

Os mecanismos de ação do AIA nos sistemas biológicos ainda não foram completamente determinados. O fato de esse composto reunir efeitos tanto antioxidantes como prooxidantes merece ser mais bem esclarecido.

Sendo o AIA um produto do metabolismo do triptofano, sua ingestão e absorção intestinal, com posterior elevação de AIA no tecido cerebral, pode causar alteração na biossíntese de serotonina (5-HT). Espera-se com isso que a 5-HT, aumentada pela ingestão de AIA, pode modificar o comportamento animal no sentido de reduzir o estresse fisiológico geral e contribuir para melhorar a qualidade de vida e a produtividade de animais suplementados com AIA.

2.2 Metabolismo celular e o estresse oxidativo

As células são unidades adaptativas a um variado número de situações e estímulos fisiológicos e/ou patogênicos. Os diferentes estímulos a que são constantemente submetidas podem gerar, nas células, fatores que desencadeiam o envelhecimento e a morte celular. Neste contexto, as atividades metabólicas são alteradas em sua intensidade, frequência ou duração e sistemas celulares de defesa são acionados.

Para que as células realizem todas as suas funções vitais, entre as quais a defesa antioxidante, o fornecimento de energia celular obtido principalmente pela degradação do trifosfato de adenosina (ATP) deve ser assegurado sendo fundamental o suprimento de substratos energéticos como a glicose. Nos processos de metabolização da glicose participam um variado número de enzimas, entre elas a hexoquinase que promove a fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato e a lactato

desidrogenase que cataliza a reação de redução do piruvato em lactato pelo NADH, quando em condições de anaerobiose. O aumento ou diminuição da atividade dessas enzimas pode ser quantificado e dão um indicativo do metabolismo da glicose na célula. A Figura 2 mostra um esquema das reações bioquímicas e as enzimas que participam da degradação da glicose a lactato.

Figura 2 – Metabolismo da Glicose (MOTTA, 2005)

A glicose-6-fosfato gerada pela fosforilação da glicose é utilizada na via das pentoses para formar outros compostos, como a ribose e o NADPH. A ribose será utilizada para a síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos e o NADPH será utilizado, dentre outras, em reações antioxidantes. Oliveira et al. (2007) quantificaram a atividade da G6PDH no fígado de ratos tratados com diferentes doses de AIA e observou que o valor obtido nos animais tratados não foi diferente estatisticamente do observado nos controles. Esses autores sugeriram que o estado inalterado da atividade da G6PDH, portanto o estado redox, mostra que o AIA não atuou como um agente oxidante.

Na linha de defesa celular contra lesão encontram-se os sistemas antioxidantes, que neutralizam a ação das espécies reativas do oxigênio formadas durante o metabolismo oxidativo. Consideram-se como espécies reativas de oxigênio (EROs) todas aquelas moléculas que contêm um oxigênio num estado altamente reativo e com alta capacidade oxidativa (KOHEN; NYSKA, 2002).

Quando acontece o desbalanço entre a quantidade de EROs produzida e a removida pelos sistemas antioxidantes, tem-se estabelecido um estresse oxidativo causador de danos moleculares às estruturas celulares e conseqüente alteração prejudicial ao funcionamento do organismo (DRÖGE, 2002). Esses danos podem ser observados em diversos tecidos e órgãos como fígado, músculos e tecido adiposo (BARJA DE QUIROGA, 1992; GOLDFARB, 1993), sistemas vascular (DUARTE et al., 1993; FENSTER et al., 2002) e nervoso (SIGNORI; SIGNORINI, 1993; HALLIWEL, 1995; KEYNES, GARTHWAITE, 2004).

Entretanto, sabe-se que as EROs estão envolvidas em vários processos fisiológicos incluindo a atividade neural e as respostas produzidas pelo sistema nervoso (CARDOSO et al, 2006). Nesse sentido, parece que as EROs podem

modular as funções cardiovasculares por produzir alterações nos mecanismos centrais de controle dos sistemas simpático e parassimpático. Logo, desequilíbrios na sinalização mediada por espécies reativas de oxigênios podem contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a hipertensão (CARDOSO et al., 2006).

As EROs também estão envolvidas em mecanismos de defesa celular contra patógenos intectantes. Nesse sentido, ficou estabelecido que neutrófilos estimulados por bactérias produzam EROs com a finalidade de destruir o microrganismo invasor (POULSEN et al., 2000; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Contudo, os efeitos das EROs em eventos patológicos como mutação de DNA, carcinogênese, envelhecimento, arterosclerose, danos por radiação, inflamação, diabetes *mellitus*, doenças neurodegenerativas e injúrias tóxicas (DAS; VASUDEVAN, 2007) são os mais estudados.

Figuram entre as EROs as espécies radicalares (os radicais livres) como o superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e o radical hidroxil ($HO^{\cdot}$) e as espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KOHEN; NYSKA, 2002). Um radical livre tem como definição qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula com um elétron não pareado ocupando uma órbita externa, como ânion superóxido, o radical hidroxil e o óxido nítrico. Existem outros compostos igualmente reativos que não possuem um elétron desemparelhado na última camada, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o cátion nitrosonium (NO^+), o ânion nitroxila (NO^-) e o peroxinitrito ($OONO^-$). Tanto num grupo quanto no outro, os compostos podem ser chamados de espécies reativas de oxigênio (DRÖGE, 2002).

O radical hidroxil é o mais potente oxidante em sistemas biológicos. Tem um tempo de vida extremamente curto (1×10^{-9} s) e apresenta alta reatividade a uma

grande variedade de moléculas orgânicas, pois necessita somente de mais um elétron para se estabilizar (ROVER JÚNIOR, 2001; YU, 1994). A combinação do radical hidroxil com metais associados ao DNA promove modificações das bases nitrogenadas e inativação ou mutação gênica. Nas membranas celulares, o radical hidroxil promove a lipoperoxidação devido a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os metais de transição, como o ferro e o cobre, tem confirmada ação catalítica na formação de lesões oxidativas decorrentes da produção de radical hidroxil (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). O ferro é o metal mais abundante no organismo e atua como cofator importante para a atividade biológica de várias proteínas. Nas reações de Fenton e de Haber-Weiss é possível observar que o radical hidroxil é produzido com a efetiva participação do ferro ou do cobre (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), como é mostrado a seguir nas equações 1 e 2.

Reação de Fenton:

Reação de Haber-Weiss:

Os agentes que protegem as células contra os efeitos das EROs podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (SIES, 1993). O sistema enzimático é constituído por várias enzimas como a superóxido dismutase

(SOD), catalase (CAT), glutational peroxidase (GPx) e glutational redutase (GR) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004). O sistema não enzimático pode ser classificado em endógeno, tendo como princípios a bilirrubina, a melatonina, o ácido úrico, a coenzima-Q além de outros produtos metabólicos, e os exógenos como o ácido ascórbico, a vitamina E (α -tocoferol), os polifenóis e o selênio, entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004).

As enzimas antioxidantes fazem parte da primeira linha de defesa contra a toxicidade das EROs no organismo e cada enzima antioxidante é responsável por uma ação protetora específica. Nesse contexto, torna-se possível classificar duas linhas de proteção enzimática: uma linha de proteção que atua como detoxificadora dos agentes antes que estes causem lesão, e uma linha de defesa que tem a função de reparar a lesão ocorrida. Na primeira linha encontram-se as enzimas SOD e CAT e a glutational reduzida (GSH). Na segunda linha encontram-se as enzimas GR e GPx e os metabólitos do ácido ascórbico e a GSH (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As duas principais isoformas da SOD são a Cu-Zn-SOD, que atua principalmente no citossol, e a Mn-SOD, que atua na matriz mitocondrial (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; 2004). A SOD reduz o radical superóxido para formar peróxido de hidrogênio e gás oxigênio (O_2), como é mostrado na equação 3 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004).

A catalase é encontrada basicamente nos peroxissomas das células animais. Possui em sua estrutura o Fe^{3+} , que compõem o grupo prostético heme da proteína, importante para efetuar a reação catalítica. A função da catalase é reduzir o

peróxido de hidrogênio em água e oxigênio como mostrado na equação 4 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2004).

A glutathiona peroxidase e a glutathiona redutase agem em conjunto para eliminar os hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos. A GPx e a GR estão distribuídas tanto no citossol quanto na mitocôndria das células (JI et al., 1988). A atividade da GPx está relacionada ao consumo do co-substrato GSH que é convertido em GSSG (glutathiona oxidada). A regeneração do GSH no meio celular é efetuada pela GR tendo como participante o NADPH. Este sistema enzimático é mostrado na Figura 3 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004).

Figura 3 - Representação esquemática da eliminação de hidroperóxidos através das enzimas Glutathiona peroxidase (GPx) e Glutathiona redutase (GR) agindo sobre o substrato glutathiona .

Quando ocorre o excesso de agentes oxidantes e/ou a deficiência do sistema antioxidante, a produção de GSSG e a depleção de GSH ficam aumentadas. Isso caracteriza o estresse oxidativo e a sua magnitude. Assim, nos sistemas biológicos, a razão GSSG/GSH mostra o estado oxidativo celular. Beehler et al. (1989) observou pela primeira vez que a razão GSSG/GSH aumentou em pulmão de ratos submetidos da hiperoxia por 48 horas.

Quando as EROs são geradas podem promover a peroxidação dos lipídios da membrana celular o que acarreta alterações em sua estrutura e na sua permeabilidade (MELLO FILHO; HOFFMAN; MENEHINI, 1983). Em virtude disso, há perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos (malonaldeído), culminado com a morte celular (HERSHKO, 1989).

Fica evidente que a mensuração da atividade das enzimas antioxidantes e dos níveis de GSH e GSSG são ferramentas importantes quando se deseja avaliar o sistema antioxidante e o estresse oxidativo em células e tecidos, bem como avaliar a influência de diferentes substâncias, como o AIA, sobre esse sistema.

A quantificação de produtos gerados na peroxidação lipídica, avaliados pela quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), é ferramenta para avaliar danos celulares decorrentes do estresse oxidativo. Prada et al. (2004) verificaram que os valores de TBARs estava aumentado no plasma de ratos submetidos a esforço físico e sugeriu que o protocolo de treinamento aplicado foi eficaz para reduzir lesões musculares.

Kashif, Zaidi e Banu (2004) verificaram que a atividade das enzimas SOD, CAT e os níveis de glutatona foram significativamente menores em cérebros de ratos submetidos a contenção por 6 horas quando comparado ao controle. Contudo,

os níveis de TBARs foram maiores nos cérebros desses animais, indicando que o estresse aplicado promoveu aumento da peroxidação lipídica e provavelmente lesão celular.

Em plantas, os sistemas antioxidantes produzem substâncias como taninos, fenóis, alcalóides, ligninas, cafeínas e aminas (LARSON, 1988; COTELLE, 1996; OKADA et al., 1996) que possuem a capacidade de eliminar radicais livres e/ou espécies reativas e de quelar metais reativos (CHUN et al., 2005).

O uso de vegetais ricos em compostos antioxidantes tem sido preconizado para fornecer ao organismo um aporte contra as EROs e evitar ou tratar doenças. Destaca-se o uso das chamadas ervas aromáticas, das vitaminas e de minerais.

Chun et al. (2005) observaram que o orégano, alecrim, tomilho e menta possuem relevantes aplicações antioxidantes por possuírem alto conteúdo de compostos fenólicos. Esses autores constataram que o óleo de orégano apresentou um efeito antimicrobica contra a bactéria *Helicobacter pylori* que é responsável por desencadear um tipo crônico de gastrite.

Corsino et al. (2003) observaram uma ação antioxidante em infusões de folhas de *Maytenus aquifolium*, planta largamente usada no tratamento de úlcera gástrica. Seu poder antioxidante protege a mucosa estomacal das espécies reativas de oxigênio formadas no processo crônico da gastrite e posterior úlcera gástrica.

Fukumasu et al. (2006) demonstrou que o guaraná atua suprimindo a carcinogênese química induzida pelo *N*-nitrosodietilamina.

No contexto da Zootecnia, merecem destaque os trabalhos que investigam o uso de antioxidantes na dieta animal e no tratamento dos produtos obtidos após o abate. Em bovinos leiteiros, a adição de vitamina A, vitamina E, vitamina D3 e selênio na dieta reduz o nível de produtos resultantes da peroxidação lipídica no leite

(PASCHOAL et al., 2006; CASTILLO et al., 2005) e são capazes de retardar a oxidação de proteínas no leite (HAVEMOSE et al., 2004). A suplementação com vitamina E para vacas leiteiras, no pré e pós parto, melhora a atividade das células fagocitárias, prevenindo a incidência de mastite clínica (POLITIS et al., 1995; NDIWENI; FINCH, 1996; VALLE, 2005).

O uso de vitamina E, vitamina C e ácido lipóico na dieta de animais de corte está relacionado com a maior estabilidade da cor e menor oxidação dos lipídeos da carne (LAURIDSEN et al., 1999; HARRIS et al., 2001; ROWE et al., 2004; RENTFROW et al., 2004; BEKHIT et al., 2005) e pode ser uma alternativa viável para minimizar a oxidação de lipídios e proteínas induzida pela irradiação da carne (DOGBEVI et al., 1999; LACROIX et al., 2002; AHN, 2004; BREWER, 2004; PLACEK et al., 2004).

Para uma possível aplicação do AIA, como suplemento em ração ou sua aplicação clínica, é fundamental o estudo de seus efeitos sobre diferentes células e tecidos. Nesse sentido e pensando na aplicação Zootécnica futura do AIA torna-se importante investigar os seus efeitos sobre músculos esqueléticos e sobre o sistema nervoso. Pode-se sugerir que as doses de AIA que promovem efeito protetor, referido como um aumento na atividade fagocitária de neutrófilos e linfócitos, deva também promover influência sobre o metabolismo de músculos e do cérebro.

2.2.1 O músculo esquelético

Os músculos esqueléticos recebem esta denominação por apresentarem pontos de fixação no esqueleto. São freqüentemente recrutados para gerar força e movimento e têm como funções principais a locomoção e postura do animal.

As células que constituem os músculos esqueléticos são chamadas de fibras esqueléticas ou miofibras e possuem características estruturais que permitem o desempenho adequado de suas funções.

Os vários músculos esqueléticos que compõem o corpo de um animal estão altamente adaptados, mesmo quando são recrutados em situações de estresse e resistência à fadiga. Esta plasticidade metabólica resulta no desenvolvimento de diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas com características de expressão genética, propriedades fisiológicas, bioquímicas e morfológicas distintas (KELLY; RUBINSTEIN, 1994)

Várias classificações foram propostas para identificar os tipos de fibras esqueléticas. STEIN e PADYKULA (1962) verificaram a presença de três tipos de fibras em músculo gastrocnêmio de rato e as classificou usando como características a intensidade da reação histoquímica e o diâmetro da fibra que ficaram descritas como (intensa/pequeno diâmetro; moderada/diâmetro intermediário e fraca/maior diâmetro).

A população das fibras oxidativas e glicolíticas em um músculo esquelético permite identificar diferenças na sua coloração a fresco, sendo uns mais vermelhos e outros denominados brancos. A coloração do músculo é devido à quantidade de mioglobina, uma proteína armazenadora de oxigênio, e de citocromo que as fibras musculares concentram (ÉSBERARD, 1991).

Apesar da variedade de classificações encontradas na literatura para os tipos de fibras musculares, três tipos principais têm sido considerados: as vermelhas, de pequeno diâmetro, contração lenta e metabolismo oxidativo, as vermelhas, de diâmetro intermediário, contração rápida e metabolismo oxidativo/glicolítico e as brancas de contração rápida e metabolismo glicolítico. São classificadas como I, IIA e IIB, respectivamente (DUBOWITZ, 1985; OGATA, 1988).

Sabe-se que os tipos de fibras musculares respondem diferentemente a um variado número de situações. Melo e Ownby (1996) verificaram que o músculo extensor longo dos dedos (EDL) de camundongo, composto predominantemente por fibras tipo II glicolíticas, era mais afetado pelo veneno bruto de algumas espécies de serpentes que o músculo sóleo, composto predominantemente por fibras tipo I, oxidativas.

Morini et al. (1998) verificaram que tanto as fibras musculares do tipo I como as do tipo II que compõem os músculos sóleo e gastrocnêmio de camundongos sofreram alterações morfológicas após a inoculação da ACL, uma miotoxina isolada do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*.

O sistema enzimático antioxidante no músculo esquelético está relacionado com sua característica metabólica. Assim, considerando-se a população de diferentes tipos de fibras musculares no músculo esquelético, a resposta enzimática antioxidante deve ser dependente dessa característica estrutural (POWERS et al., 1994).

Smolka et al. (2000) verificaram que a atividade das enzimas SOD, CAT e GR aumentou no músculo sóleo de ratos submetidos ao protocolo de treinamento físico. Entretanto, Prada et al. (2004) investigaram biomarcadores do estresse oxidativo e antioxidante no plasma de ratos e verificaram que a atividade das

enzimas CAT e GR foi maior nos animais submetidos ao protocolo de natação quando comparada ao controle, mas os valores de TBARS foi maior nos animais treinados, indicando que o protocolo de treinamento aplicado foi suficiente para prevenir o estresse oxidativo mas não para prevenir lesões musculares.

Assim, para se estabelecer os efeitos de substâncias com propriedades antioxidantes, como o AIA, é interessante investigar a resposta produzida em músculos com metabolismo oxidativo e com metabolismo glicolítico. Os músculos oxidativos são ricos em mitocôndrias e capilares enquanto os músculos glicolíticos são pobres nessas estruturas (YU et al. , 2008)

Nesse trabalho, os músculos sóleo e gastrocnêmio foram utilizados para investigar os efeitos do AIA no metabolismo da glicose e no metabolismo oxidativo, considerando a atividade específica de enzimas relacionadas a esses processos. O sóleo é considerado um músculo de metabolismo típico oxidativo e o gastrocnêmio um músculo misto, e foram escolhidos também em virtude do volume tecidual necessário para fazer as análises bioquímicas padronizadas no laboratório.

2.2.2 Os Neurônios e a atividade elétrica cerebral.

Os neurônios são células altamente diferenciadas em suas características estruturais e funcionais e compõe o principal centro de controle de todas as funções dos sistemas biológicos, o cérebro.

Uma das principais funções dos neurônios é a de coordenar o funcionamento de outras células e desencadear respostas fisiológicas decorrente do estímulo prévio que receberam. Para tanto, os neurônios produzem mensageiros químicos

(neurotransmissores ou neuromoduladores) que são liberados extracelularmente, na fenda sináptica, após ter sido alterado o potencial elétrico da membrana neuronal.

Alguns neurotransmissores são produzidos pela conversão de aminoácidos. No Sistema Nervoso Central, a descarboxilação do triptofano produz 5-hidroxitriptamina (5-HT) e triptamina. A triptamina pode ser convertida em AIA, processo dependente da ação da enzima mono-amina-oxidase que também é conversora de outros neurotransmissores centrais como a Dopamina, Noradrenalina e Histamina. A serotonina pode ser convertida em melatonina e ácido 5-hidroxi-indol-3-acético (5-HIAI) (MILLS; FINLAY; HADDAD, 1991).

As correntes elétricas geradas na membrana neuronal se propagam no tecido nervoso podem ser detectadas por eletrodos fixado na superfície do escalpo. Ao registro gráfico da variação da amplitude da atividade elétrica cerebral em função do tempo deu-se o nome de eletroencefalograma (EEG).

O que determina o padrão de atividade elétrica cerebral é o nível da atividade cerebral no momento que o sinal elétrico é adquirido e o número de neurônios que disparam em sincronismo resulta a intensidade dos sinais cerebrais. Uma intensidade muito baixa do sinal é resultante do disparo assíncrona de neurônios (COSTA, 2005).

O sistema nervoso central é vulnerável ao estresse oxidativo devido a elevada concentração de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas celulares e ao reduzido conteúdo de enzimas antioxidantes (GUTTERIDGE, 1995). O estresse oxidativo afeta a plasticidade sináptica, a morfologia dos dendritos e a neurogênese, que por sua vez determinam patologias como Parkinson, Alzheimer e Esquizofrenia (KASHIF; ZAIDI; BANU, 2004). Assim, é de fundamental importância investigar os efeitos de substâncias com potencial antioxidante sobre o cérebro e avaliar, não

somente a atividade de enzimas antioxidantes, mas também a resposta fisiológica que determina um perfil eletroencefálico.

O estudo do perfil do EEG permite verificar que a atividade elétrica cerebral é oscilatória, normalmente irregular e contínua e dependente do nível de atividade do cérebro. O sinal de EEG possui ainda características de assimetria temporal, caóticas e não lineares (KOZMA; FREEMAN, 2002).

Em algumas situações, as oscilações presentes no EEG assumem um padrão temporal característico, como o observado nos diferentes estágios do sono e em quadros de epilepsia (KOTAGAL; YARDI, 2008) e o uso de técnicas de processamento de sinais digitais constitui uma ferramenta importante para se identificar alterações no perfil do EEG em domínios diferentes.

O padrão da atividade elétrica cerebral de ratos pode ser avaliado usando-se a técnica de aquisição de sinais de EEG desenvolvida por Silva (2005) para bovino, pois o equipamento desenvolvido apresentou características muito importantes, como sensibilidade, fácil manuseio, transmissão à distância de até 60 metros e baixo custo. Os resultados dessas análises são importantes quando se investiga o efeito de compostos, como o AIA, no cérebro de animais.

2.3 O EEG em ratos

O EEG é a principal fonte de informação, obtida de forma não invasiva, da atividade elétrica cerebral e tem sido usada para diferentes finalidades, como interface cérebro computador (BCI - Brain Computer Interface) para indivíduos com sérios danos motores (COSTA *et al.*, 2000), para monitorar e estudar o

comportamento de bovinos (COSTA, 2005) e como método de análise sensorial de alimentos (HASHIDA et al, 2005) e em quadros de epilepsia (KOTAGAL; YARDI, 2008).

Um equipamento de EEG é composto de um sistema eletrônico formado por amplificadores de instrumentação, filtros ativos capazes de amplificar sinais (da ordem de um micro volts) e por eletrodos que aos pares formam os canais do EEG. O sistema deve conter também um eletrodo de referência (terra). Todos os canais devem estar ligados ao sistema de amplificação eletrônica.

Os eletrodos compõem o sistema de captação do sinal biológico e funcionam como uma interface entre o corpo do animal e o sistema eletrônico que irá medir o sinal. Em ratos, devido às dimensões do cérebro do animal, a captação do sinal elétrico cerebral é feita com um par de eletrodos de agulha que, são implantados intracranialmente, caracterizando um método invasivo de EEG.

Os métodos invasivos de EEG requerem a implantação cirúrgica dos eletrodos que são posicionados com o auxílio de uma torre estereotáxica que permite definir coordenadas e assim, implantar os eletrodos em áreas específicas do cérebro (DRINGEBERG; DIAVOLITSIS, 2002; RADEK; DECKER; JARVIS, 2004; SCALLET et al., 2004; DIMPFEL, 2005, IHMSEN et al, 2008).

Dringeberg e Diavolitsis (2002) implantaram os eletrodos para EEG na região do córtex sensório-motor de ratos e a coleta do EEG foi realizada 7 dias após os procedimentos cirúrgicos. Bo et al. (2003) implantaram os eletrodos um à direita e outro à esquerda na região frontal do crânio do rato e o EEG foi realizado após três dias da implantação. Radek, Decker e Jarvis (2004) implantaram os eletrodos bilateralmente no córtex parietal dos ratos e realizaram os protocolos experimentais após duas semanas.

A Figura 4 mostra um esquema do crânio do rato e os locais onde os autores implantaram os eletrodos para coleta de EEG (LAPRAY et al., 2008).

Figura 4 - Localização de eletrodos para coleta de EEG implantados no crânio de rato (LAPRAY et al., 2008)

Neste trabalho, foi desenvolvido um sistema não invasivo de captação de EEG para ratos, construído a partir de eletrodos de agulha. Esse sistema foi fixado na superfície da pele na cabeça do animal e o EEG foi adquirido por um sistema telemétrico de aquisição de sinal cerebral desenvolvido por Silva (2005) e Arce (2008) para bovinos.

A aquisição de sinais de EEG em animais apresenta dificuldades técnicas com relação ao ambiente de estudo. Normalmente o animal é retirado do seu “habitat” e condicionado no local onde é feita a aquisição dos sinais. Segundo Brockway e Hassler (1993), o uso de métodos de contenção durante a experimentação permite que se faça coleta de dados de animais conscientes, mas pode introduzir artefatos relativos ao estresse devido à manipulação dos animais.

Nesse sentido, minimizar ou eliminar as fontes de estresse externo é fundamental para entender o evento que está sendo avaliado.

Por este motivo, faz-se necessário o uso de um sistema telemétrico, pois a rádio-telemetria permite a medida de sinais biológicos de animais conscientes e que podem se mover livremente (BROCKWAY; HASSLER, 1993). A maior vantagem desta metodologia é que o animal não sofre estresse decorrente do confinamento ou da presença humana durante a coleta de dados (GACSALYI; ZABIELSKI; PIERZYNOWSKI, 2000).

Lapray et al. (2008) desenvolveram um sistema telemétrico de EEG em miniatura que foi implantado cirurgicamente na superfície da calota craniana de ratos e permitiu monitorar a atividade de animais sob diferentes condições. Segundo os autores, várias vantagens são oferecidas pelo sistema, como o monitoramento do comportamento dos animais sem a interferência da presença do experimentador que pode manter-se a uma distância aproximada de 3 m do animal. Contudo, os procedimentos cirúrgicos exigem medidas de profilaxia para evitar infecções no animal bem como o uso de analgésico, além da necessidade de um intervalo de tempo pós-cirúrgico para início das atividades experimentais. Nesse sentido, os métodos desenvolvidos por Silva (2005) para bovinos apresentam maiores vantagens, pois não é invasivo e a distância de transmissão do sinal é maior.

O emprego de métodos não invasivos reduz a possibilidade da introdução de artefatos gerados por estímulos de dor que normalmente implantes cirúrgicos podem causar. Ihmsen et al. (2008) verificaram que vários agentes anestésicos voláteis causaram modificações no perfil eletroencefalográfico dos ratos sob condições anestésicas. Esse fato deve ser considerado quando se faz uso de métodos invasivos para o estudo de drogas sobre o padrão de EEG de animais acordados.

2.4 Processamento de sinais digitais

Segundo Costa (2005), o processamento digital de sinais é a matemática, o algoritmo e os procedimentos computacionais usados para manipular os sinais obtidos após a conversão desses em uma forma digital.

O emprego de métodos de processamento digital de sinais possibilita retirar mais informações dos sinais de EEG do que o obtido na sua representação na forma de uma série temporal. Tais métodos de processamento compreendem a análise de Fourier (SILVA, 2005), tempo-freqüência (QIAN; CHEN, 1996; MARCHANT, 2003), Wavelets (DAUBECHIES, 1992), modelos não lineares e da teoria de sistemas complexos (COSTA; CABRAL, 2000).

Geralmente, o sinal do EEG é filtrado utilizando a transformada rápida de Fourier (FFT) em quatro bandas de freqüências típicas de sinal cerebral: delta (0,5-4 Hz), theta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (12-30 Hz) (DRINGEBERG; DIAVOLITSIS, 2002; RADEK; DECKER; JARVIS, 2004; SCALLET et al., 2004, DIMPFL, 2005, IHMSEN et al., 2008). Dringeborg e Diavolitsis (2002) filtraram os sinais de EEG obtidos de ratos tratados com diferentes fármacos nessas bandas de freqüências e observaram aumento nas amplitudes dessas freqüências após a administração de reserpina e escopolamina. Esses autores também verificaram que a fluoxetina, um inibidor da recaptação da serotonina, não promoveu aumento suficiente da serotonina para normalizar a transmissão serotoninérgica e o EEG.

Lapray et al. (2008) usou a densidade espectral de potência para analisar o EEG de ratos sob diferentes condições. Esses autores observaram que as freqüências presentes no EEG aparecem mais em algumas situações do que em

outras, como por exemplo, sob ação do anestésico isoflurano que promoveu uma depressão do perfil do EEG.

A análise da amplitude dos sinais nas bandas de frequências típicas do EEG é o método mais amplamente utilizado para avaliar o EEG de ratos. Contudo, como o valor da amplitude pode sofrer interferência de um maior número de variáveis, a medida da energia (proporcional ao quadrado da amplitude) do sinal nessas frequências em trechos de sinais definidos e livres de artefatos (onde não ocorreu saturação) é mais interessante.

3 OBJETIVOS

Nesse trabalho objetiva-se testar a hipótese que o ácido indol-3-acético altera a atividade de enzimas ligadas ao metabolismo celular e a atividade elétrica cerebral.

3.1 Objetivos específicos

Avaliar a ação de diferentes doses de AIA (1, 18 e 40 mg/Kg de peso vivo) nos músculos sóleo e gastrocnêmio e no cérebro de ratos através de:

- Análise da atividade das enzimas antioxidantes: SOD, CAT e GR.

Avaliar a ação de diferentes doses de AIA (1, 18 e 40 mg/Kg de peso vivo) no metabolismo da glicose dos músculos sóleo e gastrocnêmio de ratos através de:

- Análise da atividade das enzimas do metabolismo da glicose: HQ, LDH e G6PDH.

Avaliar a ação de diferentes doses de AIA (1, 18 e 40 mg/Kg de peso vivo) no cérebro de ratos através de:

- Mensuração dos produtos da peroxidação lipídica como as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)

Avaliar a ação do AIA na dose 40 mg/Kg de peso vivo sobre a atividade elétrica cerebral de ratos através de:

- Um método não invasivo de captação de EEG desenvolvido nesse trabalho para ratos.
- Análise do perfil eletroencefalográfico considerando a energia obtida das frequências de ondas delta (0,3-4 Hz), teta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (12-30 Hz).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos apresentados neste trabalho foram todos de grau analítico adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.2 Preparo do ácido indol-3-acético (AIA)

As soluções de AIA de diferentes concentrações administradas nos animais foram preparadas a partir de uma solução estoque (10 mg/mL) mantida sob refrigeração. O AIA foi dissolvido em solução fosfato salina, pH 7,4 (*phosphate buffer saline*, PBS) acrescida hidróxido de sódio (NaOH) 5 mol/L até a completa dissolução deste ácido. O pH foi ajustado para 7,4 usando ácido clorídrico (HCl) 25% (v/v).

4.3 Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos criados e mantidos no biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, SP, acomodados em gaiolas plásticas (23x40x17 cm) coletivas (4 animais) com cama de maravalha e que permaneceram

em sala climatizada com temperatura controlada (23 °C) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os animais receberam água e ração (Labina-Purina) sem restrição.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo em setembro de 2004, projeto intitulado *Influência da administração de ácido indol-3-acético sobre a função e o metabolismo celular em ratos* (ANEXO 1).

4.4 Delineamentos experimentais

Foram realizados dois grupos distintos de experimentos, um para avaliar a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo oxidativo e o metabolismo da glicose nos músculos sóleo e gastrocnêmio e no cérebro dos animais e outro para adquirir e avaliar o perfil do eletroencefalograma.

4.4.1 Experimentos para determinação da atividade enzimática.

Foram selecionados ratos com peso variando entre 110-150 g no início dos experimentos, mantidos sob as condições descritas no item 4.3, divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais assim distribuídos:

Controle: animais que receberam 1ml tampão fosfato salina, pH 7,4 (PBS)

T1: animais que receberam solução de AIA em PBS (1mg/Kg peso vivo);

T2: animais que receberam solução de AIA em PBS (18mg/Kg peso vivo)

T3: animais que receberam solução de AIA em PBS (40 mg/kg peso vivo).

As soluções foram administradas em dose única diária, via intragástrica (gavagem), durante 14 dias. Os animais tiveram seus pesos avaliados uma vez por semana para verificar o ganho de massa corporal e para ajuste das doses.

Os animais do grupo controle e T3 tiveram a taxa glicêmica avaliada no primeiro, sétimo e décimo-quarto dia do período experimental. Esse procedimento foi adotado pois o AIA foi referido na literatura como uma substância hipoglicemiante e esse efeito poderia interferir no metabolismo celular. Foi respeitado o período de jejum por 12 horas nos dias de coleta de sangue e a verificação da glicemia foi realizada imediatamente antes (tempo zero) e após 180 min da administração da solução. As alíquotas do sangue total foram obtidas pela perfuração com agulha descartável 0,7x25mm da veia caudal e as análises foram realizadas utilizando-se glicosímetro portátil (Accu-chec Advantage-Roche).

A eutanásia dos animais foi realizada no 15º dia após início da experimentação. Os músculos sóleo e gastrocnêmio e o cérebro dos animais foram removidos e armazenados em nitrogênio líquido para as posteriores análises bioquímicas realizadas no Laboratório de Química Biológica do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, SP.

Foram quantificados: a atividade específica das enzimas GR, CAT e SOD nos músculos sóleo e gastrocnêmio e no cérebro as enzimas HQ, LDH e G6PDH nos músculos sóleo e gastrocnêmio, TBARs no cérebro e proteínas totais nas amostras.

4.4.1.1 Extração das enzimas dos tecidos

Para verificar a atividade das diferentes enzimas de interesse neste trabalho, os músculos sóleo e gastrocnêmio e o cérebro dos animais foram degelados e pesados. Cada amostra foi triturada em homogeneizador tipo "potter" de alta velocidade durante 2 minutos na proporção de um grama de amostra para 10 mL de tampão de extração. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm (CIENTEC CT-14000, Brasil) sob refrigeração, durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente com uma pipeta Pasteur, transferido para tubos sob gelo e as alíquotas dessas amostras foram utilizadas nas diferentes técnicas bioquímicas utilizadas neste trabalho.

Utilizou-se tampão fosfato (10 mmol/L – gelado: 4,0 °C) em pH 7,4 para extração e posterior determinação da atividade das enzimas SOD, CAT, GR, HQ, LDH.

Para determinar a atividade da enzima G6PDH as amostras foram homogenizadas em meio constituído de Tris-HCl (50 mmol/L) contendo EDTA (1 mmol/L) e sulfato de magnésio (MgSO_4) (5 mmol/L) em pH 8,0.

4.4.1.2 Atividade específica da glutathiona redutase (GR)

Atividade específica da glutathiona redutase nos músculos sóleo e gastrocnêmio e no cérebro foi determinada com base na mensuração da velocidade de oxidação do NADPH com a concomitante redução da glutathiona redutase oxidada (CARLBERG; MANNERVIK, 1985).

O meio de ensaio foi composto de tampão fosfato de potássio (100 mmol/L, pH 7,0) contendo EDTA (1 mmol/L), NADPH (0,1 mmol/L), GSSG (1 mmol/L). A reação foi iniciada pela adição da amostra e acompanhada por 3 min a 25 °C. A atividade enzimática foi expressa em nmol de NADPH oxidados por minuto por miligrama de proteína.

4.4.1.3 Atividade específica da catalase (CAT)

A atividade específica da catalase nos músculos sóleo e gastrocnêmio e no cérebro foi determinada com base no consumo de peróxido de hidrogênio acompanhada espectrofotometricamente a 240 nm (BEERS; SIZER, 1952).

O meio de ensaio continha tampão fosfato de potássio (50 mmol.L⁻¹) e peróxido de hidrogênio (10 mmol.L⁻¹). A reação foi iniciada pela adição da amostra e acompanha durante 3 minutos a 25 °C. A atividade enzimática foi expressa em μmols de H₂O₂ por minuto por miligramas de proteína.

4.4.1.4 Atividade específica da superóxido dismutase (SOD)

A Atividade específica da superóxido dismutase nos músculos sóleo e gastrocnêmio e no cérebro foi determinada de acordo com a taxa de redução do *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) pelo ânion superóxido a 25°C acompanhada espectrofotometricamente a 550 nm (BEUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

O sistema xantina-xantina oxidase foi utilizado como fonte de ânion superóxido. O $O_2^{\cdot-}$ gerado no sistema reduz o NBT transformando-o em formazanas e a SOD presente na amostra competirá pelo $O_2^{\cdot-}$ inibindo a taxa de redução do NBT por este ânion.

O meio de ensaio foi constituído de tampão fosfato de sódio e potássio (53 mmol/L, pH 7,8) contendo NBT (0,10 mmol/L), xantina (0,050 mmol/L), EDTA (0,10 mmol/L) e xantina oxidase (0,013 UI). A reação foi iniciada pela adição da amostra e a reação acompanhada por 3 minutos a 25 °C. A atividade da SOD foi expressa em μ mols de NBT consumido por minuto por miligrama de proteína.

Neste ensaio o primeiro passo foi adequar a quantidade de xantina oxidase necessária para promover a redução do NBT pelo $O_2^{\cdot-}$ igual a 0,030 unidades de absorbância por minuto na ausência da amostra que contém SOD. O segundo passo foi adequar a diluição da amostra para que a redução do NBT pelo $O_2^{\cdot-}$ fosse inibida pela SOD presente nesta amostra em um valor correspondente de 20 a 40%. A diluição da amostra foi realizada em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. No final do experimento os cálculos da atividade máxima da SOD foram realizados com base na seguinte definição: uma unidade da enzima corresponde a 50% de inibição da taxa de redução do NBT (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004).

4.4.1.5 Atividade específica da hexoquinase (HQ)

A Atividade específica da hexoquinase nos músculos sóleo e gastrocnêmio foi determinada de acordo com a formação de β -nicotinamida dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH) avaliada a 340 nm (WILSON, 1989).

O meio de reação foi constituído de Tris-HCl (10 mmol/L), Tris-Fosfato (5 mmol/L), EDTA (0,1 mmol/L), cloreto de potássio (KCl) (150 mmol/L), NADP^+ (0,65 mmol/L), ATP (6,6 mmol/L), glicose (5 mmol/L), cloreto de magnésio (MgCl_2) (5 mmol/L) em pH 7,4. A amostra foi adicionada ao meio e a reação foi iniciada pela adição de glicose-6-fosfato desidrogenase (1,4 UI) e acompanhada por 3 minutos a 25 °C. A atividade foi expressa em nmols por miligrama de proteína.

4.4.1.6 Atividade específica da lactato desidrogenase (LDH)

A Atividade específica da lactato desidrogenase nos músculos sóleo e gastrocnêmio foi determinada nos músculos sóleo e gastrocnêmio com base na oxidação de NADH acompanhada espectrofotometricamente a 340 nm de acordo com o método descrito por Bergmeyer (1965). O meio de ensaio foi constituído de tampão fosfato de sódio (20 mmol/L) contendo piruvato (1 mmol/L) e NADH (0,1 mmol/L) em pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição da amostra e acompanhada por 3 minutos a 25 °C. A atividade foi expressa em μmols por miligrama de proteína.

4.4.1.7 Atividade máxima da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) nos músculos sóleo e gastrocnêmio foi determinada com base na formação de NADPH monitorado espectrofotometricamente a 340 nm (BERGMAYER; BERNT; MOLLERING, 1974). O meio de ensaio foi constituído de Tris-aminometano (86 mmol/L), MgCl_2 (6,9

mmol/L), NADP^+ (0,02 mmol/L) e triton X-100 0,05% em pH 7,6. A amostra foi adicionada ao meio e a reação foi iniciada pela adição de glicose-6-fosfato (0,06 mmol/L). A reação foi acompanhada por 4 minutos a 25 °C. A atividade foi expressa em nmols por miligrama de proteína.

4.4.2 Avaliação da peroxidação lipídica

Para se avaliar a peroxidação lipídica no cérebro através da quantificação de TBARs, primeiramente as amostras foram pesadas e trituradas em homogeneizador tipo "potter" de alta velocidade durante 2 minutos na proporção de um grama de tecido para 10 mL de tampão fosfato de sódio (10 mmol/L) gelado (4,0 °C) contendo butilato hidroxitolueno (BHT) (1% m/v) em pH 7,4. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm (CIENTEC CT-14000, Brasil) durante 10 minutos sob refrigeração. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente com uma pipeta Pasteur e transferido para tubos sob gelo.

Os produtos da peroxidação lipídica mensurados foram as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) como descrito por Buege e Aust (1978). O conteúdo de TBARs no sobrenadante foi determinado pela reação com a solução contendo ácido tiobarbitúrico (0,38%, m/v), ácido tricloroacético (15%, m/v) e ácido clorídrico (0,76%, v/v).

As amostras foram incubadas em banho fervente por 15 minutos e depois foram resfriadas mantendo-se os tubos em gelo (10 minutos) e centrifugadas a 11.500 rpm (CIENTEC CT-14000, Brasil) por 5 minutos. A absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm, zerando o aparelho

com o branco. Os TBARs foram determinados usando o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.4.3 Determinação de proteínas totais nas amostras

O conteúdo de proteínas das amostras dos músculos sóleo e gastrocnêmio e do cérebro foi determinado espectrofotometricamente pelo método descrito por Bradford (1976), usando soro albumina bovina para construção da curva padrão. Os valores de proteínas totais obtidos foram utilizados para se estabelecer a atividade específica das enzimas estudadas neste trabalho.

4.4.4 Experimentos para determinar o eletroencefalograma dos animais

Primeiramente foram selecionados aleatoriamente os ratos, acomodados em gaiolas plásticas individuais (20x23x17 cm), retirados do biotério e mantidos por 24 horas na sala de experimentação de EEG do Laboratório de Física Aplicada e Computacional (LAFAC) do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, SP. Até o início da experimentação os animais receberam água e ração sem restrição. Neste período os animais foram manipulados pelo experimentador para condicioná-los aos estímulos que receberiam durante a experimentação.

Todos os experimentos para coleta de EEG foram realizados com os animais acordados, sem restrição de movimentos na gaiola e que apresentavam aparente

normalidade fisiológica e comportamental. Foram descartados animais que apresentaram alterações comportamentais, mesmo após o início da coleta de EEG.

O EEG foi adquirido utilizando-se o sistema de aquisição telemétrico de sinais elétrico cerebral desenvolvido por Silva (2005) e Arce (2008) para bovinos que foi adaptado, neste trabalho, para ratos. O sinal elétrico cerebral foi captado por um sistema não invasivo desenvolvido, neste trabalho, partir de eletrodos de agulha que são utilizados por outros autores em procedimentos invasivos para captação de EEG.

O sistema não invasivo de captação de EEG desenvolvido consistiu de uma cânula guia de 3 cm comprimento construída a partir de uma agulha hipodérmica de aço inox 0,80x25 21G1 (BD PrecisionGlide®) onde foi acoplado o eletrodo de agulha. A base plástica da agulha serviu como suporte de apoio para colá-la com resina sintética na superfície da pele na cabeça do animal. As cânulas foram completamente preenchidas com gel de contato para eletrodos (Carbogel®) e estes não tocaram na superfície da cabeça do animal. A Figura 6 (A) mostra em detalhes este novo tipo de eletrodo.

Figura 5 – Representação da interface de captação do sinal de elétrico cerebral de ratos por método não invasivo para EEG. (A) Eletrodo desenvolvido apartir da junção de uma cânula guia acoplada a um eletrodo de agulha. (B) O sistema foi colado na superfície da pele da cabeça do animal após tricotomia. (C) Posições de captação usadas para coleta do EEG.

Em cada animal foram fixados dois eletrodos, após tricotomia. Para referenciar a posição dos eletrodos, a cabeça do animal foi dividida em quatro quadrantes imaginários que serviram como padrão para posicionar as cânulas, como mostra a Figura 6 (C). Os eletrodos foram ligados ao equipamento telemétrico juntamente com um eletrodo de referência fixado na cauda do animal.

Coletou-se 3 horas de EEG no mesmo animal. Cada uma hora de EEG correspondeu a um tratamento. O mesmo animal recebeu três tratamentos sucessivos diferentes, ficando estabelecido dois protocolos experimentais, apresentados a seguir:

Coleta de EEG	Protocolo 1	Protocolo 2
1º hora	Condição Normal	Condição Normal
2º hora	PBS	PBS
3º hora	AIA	Triptofano

As soluções de PBS (1 mL), AIA em PBS (40mg/Kg de peso vivo) e triptofano em PBS (40mg/Kg de peso vivo) foram administradas por gavagem e a coleta de EEG foi interrompida por 3 minutos para a realização desses procedimentos. O fornecimento de água e ração foi suspenso 4 horas antes do início das experimentações para as coletas de EEG. Após os experimentos, os animais foram eutanasiados com dose letal de tiopental sódico.

Optou-se por administrar triptofano em um dos grupos experimentais como referência para a comparação dos perfis de EEG obtidos, pois há relatos na literatura apontando os efeitos do triptofano na síntese de neurotransmissores centrais e no comportamento animal.

O EEG foi coletado numa frequência de amostragem de 120 Hz e o sinal digital obtido foi processado utilizando o programa de computador Matlab®. Foram analisados vários trechos sucessivos de 3 segundos livres de artefato (picos no sinal

que saturavam o amplificador) que foram decompostos em quatro bandas de frequências: delta (0,3-4 Hz), teta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (12-30 Hz) a partir de filtros elípticos de ordem 4 integrados em uma ferramenta visual desenvolvida no Matlab®, segundo o algoritmo apresentado no ANEXO 2. Nesse sistema de processamento do sinal, foi calculada em cada um dos trechos selecionados, a energia do sinal digital em cada uma das bandas de frequência. A energia do sinal digital pode ser definida como a somatória do quadrado do módulo das amplitudes em um intervalo finito (PROAKIS, MANOLAKIS, 1988)

4.4.5 Análise estatística dos resultados.

Os resultados obtidos das análises bioquímicas e do EEG foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, tratados em ANOVA. A comparação entre os grupos experimentais foi realizada usando-se o teste de Tukey em nível de significância de $p < 0.05$.

A validação dos estimadores estatísticos, média e desvio padrão, para a energia dos sinais de EEG foi realizada usando-se o método de *bootstrap* com 1000 amostragens para cada grupo de pontos. O teste de hipóteses também foi validado usando o método de *bootstrap*. Os algoritmos do *bootstrap* (ANEXO 3) foram codificados no Matlab® com algumas alterações, para serem executados na plataforma Linux 64 bits (Fedora 9) na versão 7.4 do Matlab ®.

5 RESULTADOS

Inicialmente neste trabalho procurou-se investigar os efeitos da administração de AIA no metabolismo oxidativo e no metabolismo da glicose de músculos esqueléticos e no cérebro de ratos. Para contribuir com essas análises, a taxa glicêmica e o peso corporal dos animais foi determinada durante o período tratamento dos animais (14 dias).

5.1 Taxa glicêmica e peso corporal

Na Tabela 1 são mostrados os resultados obtidos da dosagem da taxa glicêmica dos animais do grupo controle, realizada no 1º, 7º e 14º dia de experimentação. Não foram observadas diferenças estatísticas na taxa glicêmica dos ratos antes ou após 180 minutos da administração de 1 mL de tampão fosfato via intragástrica.

A taxa glicêmica dos animais tratados com AIA 40mg/kg de peso vivo (T3) via intragástrica também não foi estatisticamente diferente quando se comparou os valores obtidos antes ou após 180 minutos da administração do AIA, nos dias 1, 7 e 14 de experimentação. A comparação desses resultados com os do grupo controle mostrou que não ocorreu diferença significativa entre eles, nem no ponto zero e nem três horas após o tratamento.

Tabela 1 - Concentração de Glicose plasmática dos ratos em jejum de 12 horas sob condições de controle (receberam 1 mL de tampão fosfato pH7,4 intragástrica) no ponto 0 (zero) minutos e 180 minutos após o tratamento.

Dia da coleta	Tempo de Coleta	
	0 min	180 min
1	86,2±9,1	81,8±9,4
7	85,3±8,9	70,2±8,7
14	85,9±9,0	85,8±6,2

Os resultados da glicose estão expressos em mg/dL e representam a média $\pm$ DP (N=6). Não houve diferença significativa quando os resultados foram comparados pelo teste de Tukey, considerando valores de $p < 0,05$

Tabela 2 - Concentração de glicose plasmática dos ratos em jejum de 12 horas tratados com AIA (receberam 40mg/Kg de peso vivo via intragástrica) no ponto 0 (zero) minuto e 180 minutos após tratamento.

Dia da coleta	Tempo de Coleta	
	0 min	180 min
1	82,2 $\pm$ 8,7	79,7 $\pm$ 5,6
7	83,3 $\pm$ 5,7	67,8 $\pm$ 11,7
14	92,2 $\pm$ 6,5	80,7 $\pm$ 4,9

Os resultados da glicose estão expressos em mg/dL e representam a média $\pm$ DP (N=6). Não houve diferença significativa quando os resultados foram comparados pelo teste de Tukey, considerando valores de $p < 0,05$

Na Tabela 3 são mostrados os resultados obtidos das avaliações do peso corporal desses animais. Pode-se verificar que não houve diferença no ganho de peso entre os animais do grupo tratado com AIA quando comparados com o grupo controle.

Tabela 3 – Avaliação da evolução de peso dos ratos dos grupos controle e tratados com AIA (T3 - 40 mg/Kg de peso vivo via intragástrica), pesados no 1^o, 7^o e 14^o dia de tratamento.

Dia da Pesagem	Massa corpórea	
	Controle	T3
1	122,80 ± 11,10	120,42 ± 9,58
7	168,78 ± 12,56	161,95 ± 10,79
14	199,27 ± 18,75	194,87 ± 12,15

Os resultados da massa corpórea estão expressos em gramas e representam a média ± DP (N=6). Não houve diferença significativa quando os resultados foram comparados pelo teste de Tukey, considerando valores de $p < 0,05$

5.2 Parâmetros Bioquímicos

Os ensaios bioquímicos foram realizados em duplicata ou triplicata da mesma amostra e a média dos valores obtidos foram utilizada nas análises estatísticas.

5.2.1 Enzimas Antioxidantes nos Músculos

O resultado obtido da análise da atividade específica das enzimas relacionadas com o metabolismo oxidativo, GR, CAT e SOD, no músculo sóleo está apresentado na Tabela 4. Observou-se que a atividade das enzimas antioxidantes nos grupos tratados com diferentes doses de AIA não foi estatisticamente diferente quando comparado com o controle.

Tabela 4 – Atividade específica das enzimas glutathiona redutase (GR), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) avaliada no músculo sóleo dos ratos nos grupos controle (receberam 1 mL de tampão fosfato pH7,4 intragástrica) e tratados com AIA por via intragástrica nas doses de 1 (T1), 18 (T2) e 40 (T3) mg/Kg de peso vivo.

	Controle	AIA		
		T1	T2	T3
GR	31,94 ± 6,43	30,20 ± 4,75	29,54 ± 2,27	32,94 ± 7,06
CAT	10,36 ± 1,85	10,15 ± 1,81	9,92 ± 2,20	9,68 ± 1,80
SOD	11,47 ± 2,49	10,62 ± 2,45	10,25 ± 1,75	10,52 ± 1,81

Os resultados da GR estão expressos em nmol/min por miligrama de proteína e da CAT e SOD estão expressos em μ mol/min por miligrama de proteína e são apresentados como a média $\pm$ DP (N=6). Não houve diferença significativa entre os grupos para cada enzima, quando os resultados foram comparados pelo teste de Tukey, considerando valores de $p < 0,05$

O resultado obtido da análise da atividade das enzimas relacionadas com o metabolismo oxidativo, GR, CAT e SOD, no músculo gastrocnêmio está apresentado na Tabela 5. Também observou-se que a atividade das enzimas antioxidantes nos

grupos tratados com diferentes doses de AIA não foi estatisticamente diferente quando comparado com o controle.

Esses resultados demonstram que o AIA, nas doses administradas, não interferiu na atividade das enzimas antioxidantes GR, CAT e SOD nos músculo sóleo e gastrocnêmio e permitem sugerir que estado redox dos músculos estudados não sofreu alteração, quando o animal foi tratado com AIA.

Tabela 5 – Atividade específica das enzimas glutathiona redutase (GR), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) avaliada no músculo gastrocnêmio dos ratos nos grupos controle (receberam 1 mL de tampão fosfato pH7,4 intragástrica) e tratados com AIA por via intragástrica nas doses de 1 (T1), 18 (T2) e 40 (T3) mg/Kg de peso vivo.

	Controle	AIA		
		T1	T2	T3
GR	10,80 ± 1,74	9,46 ± 1,61	10,36 ± 2,00	9,72 ± 1,10
CAT	2,64 ± 0,37	2,23 ± 0,30	2,45 ± 0,36	2,46 ± 0,55
SOD	5,97 ± 0,80	5,60 ± 1,11	5,88 ± 1,32	4,81 ± 1,08

Os resultados da GR estão expressos em nmol/min por miligrama de proteína e da CAT e SOD estão expressos em μ mol/min por miligrama de proteína e são apresentados como a média $\pm$ DP (N=6). Não houve diferença significativa entre os grupos para cada enzima, quando os resultados foram comparados pelo teste de Tukey, considerando valores de $p < 0,05$.

5.2.2 Enzimas Antioxidantes no Cérebro

Os resultados referentes à atividade específica das enzimas relacionadas com o metabolismo oxidativo, GR, CAT e SOD no cérebro dos ratos tratados com

AIA são apresentados na Tabela 6. Observou-se que a atividade dessas enzimas nos grupos tratados com as diferentes doses de AIA não foi estatisticamente diferente do grupo controle. Esses resultados permitem sugerir que o AIA não alterou o potencial antioxidante no cérebro dos animais estudados.

Tabela 6 – Atividade específica das enzimas glutathiona redutase (GR), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) avaliada no cérebro dos ratos nos grupos controle (receberam 1 mL de tampão fosfato pH7,4 intragástrica) e tratados com AIA por via intragástrica nas doses de 1 (T1), 18 (T2) e 40 (T3) mg/Kg de peso vivo.

	Controle	AIA		
		T1	T2	T3
GR	0,033 ± 0,008	0,034 ± 0,007	0,035 ± 0,005	0,036 ± 0,006
CAT	4,617 ± 0,983	4,257 ± 0,730	4,614 ± 0,725	4,491 ± 0,801
SOD	6,011 ± 1,297	6,520 ± 1,327	6,292 ± 0,789	6,931 ± 1,152

Os resultados da GR estão expressos em nmol/min por miligrama de proteína e da CAT e SOD estão expressos em μ mol/min por miligrama de proteína e são apresentados como a média $\pm$ DP (N=6). Não houve diferença significativa entre os grupos para cada enzima, quando os resultados foram comparados pelo teste de Tukey, considerando valores de $p < 0,05$.

5.2.3 Enzimas do Metabolismo da Glicose

Os resultados obtidos nos ensaios para determinar a atividade específica das enzimas hexoquinase, lactato desidrogenase e glicose-6-fosfato desidrogenase no músculo sóleo são mostrados na Tabela 7.

Observou-se que a atividade das enzimas HQ, LDH e G6PDH nos grupos tratados com AIA não foi diferente estatisticamente quando comparadas com o respectivo controle.

Tabela 7 – Atividade específica das enzimas hexoquinase (HQ), lactato desidrogenase (LDH) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) avaliada no músculo sóleo dos ratos nos grupos controle (receberam 1 mL de tampão fosfato pH7,4 intragástrica) e tratados com AIA por via intragástrica nas doses de 1 (T1), 18 (T2) e 40 (T3) mg/Kg de peso vivo.

	Controle	AIA		
		T1	T2	T3
HQ	49,43 ± 4,90	46,26 ± 12,40	46,86 ± 5,36	44,72 ± 8,26
LDH	3,79 ± 0,93	3,58 ± 0,73	4,00 ± 0,78	3,51 ± 0,47
G6PDH	6,81 ± 1,48	6,79 ± 0,63	6,50 ± 0,36	7,71 ± 0,85

Os resultados da LDH estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}$ por mg de proteína e da HQ e G6PDH estão expressos em nmol/min por miligrama de proteína e apresentados como a média $\pm$ DP (N=6). Não houve diferença significativa entre os grupos para cada enzima, quando os resultados foram comparados pelo teste de Tukey, considerando valores de $p < 0,05$

Na Tabela 8 são mostrados os resultados obtidos dos ensaios para determinar a atividade específica das enzimas hexoquinase, lactato desidrogenase e glicose-6-fosfato desidrogenase no músculo gastrocnêmico. Observou-se que a atividade dessas enzimas nos grupos tratados com AIA não foi diferente estatisticamente quando comparadas com o respectivo controle.

Esses resultados indicam que o AIA, nas doses administradas, não interferiu no metabolismo da glicose nos músculos estudados e, portanto, não alterou o consumo de glicose desses músculos.

A atividade da enzima G6PDH não sofreu alteração nos grupos tratados com AIA em relação ao controle, indicado que não houve alteração no estado redox dos músculos esqueléticos estudados e que o AIA não promoveu ação oxidante nesses músculos.

Tabela 8 – Atividade específica das enzimas hexoquinase (HQ), lactato desidrogenase (LDH) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) avaliada no músculo gastrocnêmio dos ratos nos grupos controle (receberam 1 mL de tampão fosfato pH7,4 intragástrica) e tratados com AIA por via intragástrica nas doses de 1 (T1), 18 (T2) e 40 (T3) mg/Kg de peso vivo.

	Controle	AIA		
		T1	T2	T3
HQ	21,05 ± 2,41	22,67 ± 4,40	21,85 ± 3,77	24,24 ± 7,58
LDH	5,62 ± 1,07	5,87 ± 1,74	5,54 ± 1,16	5,99 ± 2,34
G6PDH	2,48 ± 0,75	2,38 ± 0,69	2,25 ± 0,10	2,19 ± 0,78

Os resultados da LDH estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}$ por mg de proteína e da HQ e G6PDH estão expressos em nmol/min por miligrama de proteína e apresentados como a média $\pm$ DP (N=6). Não houve diferença significativa entre os grupos para cada enzima, quando os resultados foram comparados pelo teste de Tukey, considerando valores de $p < 0,05$

5.2.4 Peroxidação Lipídica

O resultado obtidos dos ensaios para quantificar a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) no cérebro de ratos que foram tratados com diferentes doses de AIA e dos ratos controle é mostrado na Tabela 9.

Pode-se verificar que não houve diferença significativa dos valores de TBARs no cérebro de animais tratados com as diferentes doses de AIA quando comparados com o obtido dos animais do grupo controle. Esses resultados sugerem que o AIA nas doses administradas por via intragástrica durante 14 dias não promoveu aumento na formação de TBARs.

Tabela 9 – Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) no cérebro dos ratos nos grupos controle (receberam 1 mL de tampão fosfato pH7,4 intragástrica) e tratados com AIA por via intragástrica nas doses de 1 (T1), 18 (T2) e 40 (T3) mg/Kg de peso vivo.

Controle	AIA		
	T1	T2	T3
0,1681 ± 0,079	0,1108 ± 0,077	0,1498 ± 0,086	0,1762 ± 0,084

Os resultados do TBARs estão expressos em nmol/mg de proteína. Os resultados estão apresentados como a média ± DP (N=6). Não houve diferença significativa quando os resultados foram comparados pelo teste de Tukey, considerando valores de $p < 0,05$.

5.3 Perfil Eletroencefalográfico (EEG)

Para testar o novo sistema de captação do EEG desenvolvido nesse trabalho, os eletrodos foram fixados em diferentes posições na superfície da pele na cabeça do animal, após a tricotomia, com especial atenção para manter o eletrodo completamente preenchido com gel de contato. Todos os perfis elétricos obtidos apresentaram amplitudes (1 a 40 μ V) que permitiram adquirir e processar o sinal elétrico e foram amostrados a 120 Hz.

Inicialmente foi obtido o EEG dos ratos que não receberam qualquer tratamento para se determinar o perfil da atividade elétrica cerebral dos animais nas condições experimentais desse trabalho. Posteriormente, foram realizados os experimentos propostos nos protocolos 1 e 2 para a coleta de EEG.

Na Figura 6 é apresentada uma ilustração da tela do sistema de aquisição do EEG. O registro mostrado é de um animal que não recebeu tratamento (condição normal). Pode-se observar que nesse sistema o valor da energia do sinal elétrico no trecho selecionado (intervalo de pontos) para cada faixa do filtro (bandas de frequência) é automaticamente calculado.

Figura 6 – Registro de EEG adquirido de um rato sem qualquer tratamento (controle). Amostragem a 120Hz.

A decomposição do sinal de EEG nas bandas de frequências delta (0,3-4 Hz), teta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (12-30 Hz) foi obtida usando FFT implementado no software Matlab®. O algoritmo utilizado para esse propósito está apresentado no ANEXO 2. A vantagem de se avaliar o valor da energia do sinal, em detrimento da determinação da amplitude do sinal, é que se considera todas as diferentes amplitudes que aparecem no intervalo de tempo definido, que neste trabalho foi de 3 segundos (360 pontos).

Para verificar a presença das frequências típicas de sinal cerebral, foi determinada a densidade espectral de potência dos sinais de EEG. Na Figura 7 é mostrado o espectro de potência para um trecho de 3 segundo de EEG de um rato em condição normal. Esse mesmo perfil foi observado em todos os trechos de EEG analisados, demonstrando que o sistema não invasivo de captação de sinal elétrico cerebral desenvolvido nesse trabalho foi sensível para captar as frequências que caracterizam o EEG.

Figura 7 – Densidade espectral de potência para o trecho de 3s de EEG de um rato que não recebeu tratamento (condição normal). Espectro calculado usando o método de Welch com superposição de 50%. O resultado é mostrado com intervalo de confiança de 95% (linha central).

Nos animais experimentais foram coletados vários trechos contínuos de 5 min de EEG até completar uma hora de coleta para cada tratamento. Na Figura 8 é mostrado um trecho de 3 segundos do EEG de um animal na condição normal (sem tratamento). É possível observar que várias amplitudes estão presentes nesse sinal e a consideração apenas desse parâmetro pode representar a perda de informação contida no sinal de EEG. Na Figura 9 é mostrado a decomposição de um trecho de 3 segundos de EEG nas bandas de frequências (0,3-4 Hz), teta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (12-30 Hz).

Figura 8 – Gráfico do sinal de EEG de 3s referente ao intervalo (1500:1860) obtido do registro apresentado na Figura 6.

Figura 9 - Decomposição de um trecho de 3 segundos de EEG nas faixas alfa, beta, delta e teta obtido de um rato na situação normal (sem tratamento). Sinal: amplitude (mV).

A observação do sinal de EEG, como mostrado nas Figuras 8 e 9, não permitiu identificar diferenças entre os diferentes tratamentos. Contudo, após a decomposição do sinal de EEG e determinação do valor médio da energia das bandas de frequências delta (0,3-4 Hz), teta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (12-30 Hz) nos trechos de 3 segundo selecionados, pode-se verificar uma discreta alteração após os diferentes tratamentos.

Na Tabela 10 são mostrados os valores das médias da energia das bandas de frequências do EEG de um animal submetido ao protocolo 1, adquirido por uma hora antes (Normal) e após os tratamentos sucessivos com 1 mL de tampão fosfato (PBS) e com AIA (40 mg/Kg de peso vivo), por via intragástrica.

Tabela 10 – Energia do sinal de trechos de 3 segundos de EEG livres de artefato filtrados nas bandas de frequências delta (0,3-4 Hz), teta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (12-30 Hz) na condição anterior (normal) e posterior aos tratamentos (tampão fosfato-PBS; AIA - 40 mg/Kg de peso vivo).

	Energia (μV^2) das Bandas de Frequência			
	Delta	Teta	Alfa	Beta
Normal (N=32)	0,2074 $\pm$ 0,0086 ^a	0,0989 $\pm$ 0,0035 ^a	0,0898 $\pm$ 0,0020 ^a	0,0929 $\pm$ 0,0021 ^a
PBS (N=40)	0,2076 $\pm$ 0,007 ^a	0,1003 $\pm$ 0,0055 ^a	0,0901 $\pm$ 0,0019 ^a	0,0928 $\pm$ 0,0024 ^a
AIA (N=52)	0,2104 $\pm$ 0,0047 ^a	0,1062 $\pm$ 0,0181 ^a	0,0922 $\pm$ 0,0030 ^b	0,0968 $\pm$ 0,0065 ^b

Os dados apresentados foram obtidos de um animal submetido ao protocolo 1 para EEG. N=número de trechos sucessivos de 3 s livres de artefatos. Os resultados estão apresentados como a média $\pm$ DP. As letras diferentes (a, b) representam a diferença estatística para $p < 0,05$, ANOVA – Teste de Tukey, encontrada entre os tratamentos para um mesma banda de frequência.

Não foram observadas diferenças significativas no valor da energia das bandas de frequências estudadas após a administração de tampão fosfato (PBS) em relação à condição normal. Contudo, pode-se observar uma discreta diferença nos valores da energia das bandas de frequência alfa e beta do EEG após o tratamento com AIA (40 mg/Kg de peso vivo), em relação às demais condições. A energia da banda de frequência alfa apresentou um aumento significativo de 2,67% e energia da banda de frequência beta apresentou um aumento significativo de 5,21% em relação à condição normal. Não foi observada diferença significativa no valor médio da energia das bandas de frequência delta e teta após tratamento com AIA em relação às condições normal e PBS.

Para validar esses resultados, foi aplicado o teste de *bootstrap* (implementado no software Matlab®) que reamostrou em 1000 vezes os valores da energia das bandas de frequência dos trechos analisados. O algoritmo utilizado para esse propósito é apresentado no ANEXO 3.

Na Figura 10 é mostrado o gráfico da dispersão dos valores das médias da energia da banda de frequência alfa para os tratamentos com PBS e AIA (40 mg/Kg de peso vivo) reamostradas 1000 vezes. Pode-se verificar que não ocorreu a sobreposição dos valores das médias da energia da banda de frequência alfa nas condições PBS e AIA. Isso indica que a diferença observada no teste estatístico, mesmo que numericamente pequeno (aumento de 2,67% da energia da banda de frequência alfa), representa uma diferença no perfil do EEG que tende a se repetir e comprova que o AIA aumentou de forma significativa a energia da banda de frequência alfa.

Figura 10 – Dispersão dos valores da média da energia da banda de frequência alfa reamostradas 1000 vezes no *bootstrap*. EEG adquirido por uma hora após a administração de PBS e AIA (40 mg/Kg de peso vivo) sucessivamente.

Na Figura 11 é mostrado o gráfico da dispersão dos valores das médias da energia da banda de frequência beta para os tratamentos com PBS e AIA (40 mg/Kg de peso vivo). Pode-se verificar que não ocorre a sobreposição das médias após a reamostragem dos valores em 1000 vezes. Isso indica que o resultado obtido no teste estatístico, ou seja, aumento de 5,21% da energia da banda de frequência beta, é uma tendência do comportamento dessa frequência após o tratamento com AIA e comprova o resultado obtido no teste estatístico.

Figura 11 – Dispersão dos valores da média da energia da banda de frequência beta reamostradas 1000 vezes no *bootstrap*. EEG adquirido por uma hora após a administração de PBS e AIA (40 mg/Kg de peso vivo) sucessivamente.

Na Tabela 11 são mostrados os valores das médias da energia das frequências de ondas delta (0,3-4 Hz), teta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (12-30 Hz) obtidas de um animal submetido ao protocolo 2 de EEG, onde foram coletados o EEG por uma hora antes (Normal) e após os tratamentos sucessivos com 1 mL de tampão fostato (PBS) e com triptofano (40 mg/Kg de peso vivo) por via intragástrica.

Tabela 11 – Energia do sinal de trechos de 3 segundos de EEG livres de artefato filtrados nas bandas de frequências delta (0,3-4 Hz), teta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz) e beta (12-30 Hz), na condição anterior (normal) e posterior aos tratamentos (tampão fosfato-PBS; triptofano - 40 mg/Kg de peso vivo).

	Energia (μV^2) das Bandas de Frequências			
	Delta	Teta	Alfa	Beta
Normal (N=50)	0,2211 $\pm$ 0,0076 ^a	0,1059 $\pm$ 0,0052 ^{ab}	0,0971 $\pm$ 0,0034 ^a	0,1009 $\pm$ 0,0039 ^a
PBS (N=47)	0,2226 $\pm$ 0,0062 ^a	0,1072 $\pm$ 0,0053 ^a	0,1177 $\pm$ 0,1278 ^a	0,1010 $\pm$ 0,0038 ^a
Triptofano (N=52)	0,2270 $\pm$ 0,0023 ^b	0,1043 $\pm$ 0,0011 ^b	0,0980 $\pm$ 0,0007 ^a	0,0991 $\pm$ 0,0007 ^b

Os dados apresentados foram obtidos de um submetido ao protocolo 2. N=número de trechos sucessivos de 3 s livres de artefatos. Os resultados estão apresentados como a média $\pm$ DP para os N trechos do EEG analisado. As letras diferentes (a, b) representam a diferença estatística para $p < 0,05$, ANOVA – Teste de Tukey, encontrada entre os tratamentos para um mesma banda de frequência.

Não foram observadas diferenças significativas no valor das energias das bandas de frequências estudadas após a administração de tampão fosfato (PBS) em relação à condição normal. Podem-se observar uma discreta diferença entre os valores das bandas de frequência delta, teta e beta do EEG após o tratamento com triptofano (40 mg/Kg de peso vivo). Verificou-se um aumento significativo da energia da banda de frequência delta (2,66%) e uma diminuição da energia da banda de frequência beta (1,73%), após o tratamento com triptofano, em relação à condição normal. A energia da banda de frequência teta apresentou uma diminuição significativa (2,71%), após o tratamento com triptofano, em relação ao valor obtido após administração de PBS. Para essa banda de frequência, não foi observado diferença significativa entre os valores da energia obtida na condição normal e triptofano.

Esses resultados também foram testados em *bootstrap* (implementado no software Matlab® algoritmo apresentado no ANEXO 3) como realizado com os dados obtidos do animal tratado com AIA (protocolo 1 de EEG).

Na Figura 12 é mostrado o gráfico da dispersão dos valores das médias da energia da banda de frequência delta para os tratamentos com PBS e triptofano (40 mg/Kg de peso vivo). Pode-se verificar que após a reamostragem dos valores em 1000 vezes não ocorreu a sobreposição dos valores das médias da energia nas condições PBS e AIA. Isso indicando que a diferença observada no teste estatístico, mesmo que numericamente pequeno (aumento de 2,67% da energia da banda de frequência alfa), representa uma diferença no perfil do EEG que tende a se repetir e comprova que o AIA aumentou de forma significativa a energia da banda de frequência alfa.

Figura 12 – Dispersão dos valores da média da energia da banda de frequência delta reamostradas 1000 vezes no *bootstrap*. EEG adquirido por uma hora após a administração de PBS e Triptofano (40 mg/Kg de peso vivo) sucessivamente.

Na Figura 13 é mostrado o gráfico da dispersão dos valores das médias da energia da banda de frequência teta para as condições normal, PBS e triptofano (40 mg/Kg de peso vivo) reamostradas 100 vezes no *bootstrap*. Pode-se verificar que não houve sobreposição dos valores das médias entre PBS e triptofano, mas houve sobreposição entre os valores das médias de normal e PBS, confirmando os resultados do teste estatístico que mostrou diminuição na energia da banda de frequência teta após tratamento com triptofano.

Figura 13 – Dispersão dos valores da média da energia da banda de frequência teta reamostradas 1000 vezes no *bootstrap*. EEG adquirido por uma hora após a administração de PBS e Triptofano (40 mg/Kg de peso vivo) sucessivamente.

Na Figura 14 é mostrado o gráfico da dispersão dos valores das médias da energia da banda de frequência beta para as condições PBS e triptofano (40 mg/Kg

de peso vivo) reamostradas 100 vezes no *bootstrap*. Pode-se verificar que não houve sobreposição dos valores das médias entre PBS e triptofano, confirmando os resultados do teste estatístico que mostrou diminuição na energia da banda de frequência beta (1,73%) após tratamento com triptofano.

Figura 14 – Dispersão dos valores da média da energia da banda de frequência beta reamostradas 1000 vezes no *bootstrap*. EEG adquirido por uma hora após a administração de PBS e Triptofano (40 mg/Kg de peso vivo) sucessivamente.

6 DISCUSSÃO

É sabido que a administração de ácido indol-3-acético na dose de 50 mg/kg de massa corpórea, por via endovenosa, causa hipoglicemia (FULLER et al., 1971; SULLIVAN; STRONG, 1958). Neste sentido, investigou-se inicialmente neste trabalho a taxa glicêmica dos ratos tratados por 14 dias com AIA (40 mg/Kg peso vivo, via intragástrica) que não foi significativamente diferente em relação ao controle que recebeu PBS. Esses resultados sugerem que essa dose de AIA não altera os níveis glicêmicos de ratos em jejum de 12 horas e não exerce influência no ganho de peso dos animais, parâmetro que também não sofreu alteração em relação ao controle. Pode-se sugerir que a disponibilidade de glicose nos tecidos dos ratos tratados com AIA nas doses de 1, 18 e 40 mg/Kg de peso vivo não deve ter sido alterado.

A atividade das enzimas do metabolismo da glicose, hexoquinase e lactato desidrogenase, avaliadas nos músculos sóleo e gastrocnêmio não sofreu alteração após o tratamento por 14 dias com as diferentes doses de AIA utilizadas neste trabalho. Isso indica que os eventos bioquímicos que acontecem na glicólise não deve ter sido influenciado pelo AIA e que a produção energética nas fibras musculares deve ter sido mantido normalmente durante o tratamento. Gondret et al. (2004) verificaram que a atividade da LDH nos músculos de contração rápida e de contração lenta de coelho em crescimento aumentou, mas não observaram alterações no conteúdo do transportador da glicose (GLUT4) e na atividade da enzima fosfofrutoquinase e sugeriram que as etapas da glicólise não foram modificadas durante o crescimento dos animais. Contudo, o metabolismo oxidativo

desses músculos sofreu alteração, pois foi observado um aumento na atividade de enzimas mitocondriais e na taxa de oxidação mitocondrial de ácidos graxos.

A atividade da enzima G6PDH nos músculo sóleo e gastrocnêmio também não foi alterada pelo tratamento com as diferentes doses de AIA durante 14 dias. No fígado de ratos, Ferreira et al. (2006) também não observou alteração na atividade dessa enzima após o mesmo período de tratamento com AIA. Pugine et al. (2007) também não observaram alteração na atividade da G6PDH em neutrófilos e linfócitos de ratos recrutados após 14 dias de tratamento com as mesmas doses de AIA utilizadas no presente trabalho. Esses resultados sugerem que o AIA não alterou o estado redox das fibras musculares dado pela atividade inalterada da G6PDH, enzima chave na via das pentoses que promove formação de NADHP utilizado no sistema antioxidante da glutathione.

De acordo com Oliveira et al. (2007), a via de administração do AIA não interfere no seu efeito sobre o fígado de ratos, para as doses de 1, 2, 18 e 40 mg/Kg de peso vivo. Ferreira et al. (2006) verificaram que o tratamento de ratos por 14 dias com 1, 2 e 18 mg/Kg de AIA administrado tanto por via intragástrica quanto por via subcutânea não promoveu alteração na atividade específica das enzimas CAT e SOD em neutrófilos. Pugine et al. (2007) não observaram diferença na atividade das enzimas GR, CAT, SOD e G6PDH de neutrófilos e linfócitos considerando essas duas vias de administração do AIA, para aquelas doses de AIA. No presente trabalho também não foi observado alterações na atividade das enzimas GR, CAT, SOD nos músculos sóleo e gastrocnêmio e no cérebro de ratos tratados com doses de 1, 18 e 40 mg/Kg de peso vivo, sugerindo que o AIA não induziu uma resposta oxidante como proposto por Oliveira et al. (2007) e não promoveu aumento no

potencial do sistema antioxidante, considerando a atividade específica desses enzimas nos tecidos avaliados.

Não está estabelecido a cinética do ácido indol-3-acético no organismo animal a partir do momento de sua administração. Sabe-se que a concentração de AIA nos tecidos e fluídos de ratos é proporcional ao consumo de triptofano na dieta (WEISSBACH et al. 1959) e que isso também acontece em diferentes situações patológicas devido, principalmente, a modificações nessa via metabólica (ARMSTRONG; ROBINSON, 1954; JEPSON, 1959; MACKENZIE; WOOLF, 1959; WEISSBACH et al., 1959; KABORI et al., 1983; ANDERSON et al., 1984). O fato de ser ter observado alterações na atividade as enzimas avaliadas nesse trabalho não é um indicativo da ausência do AIA nos tecidos. Quando foi monitorado o EEG dos ratos imediatamente após a administração de 40 mg/Kg de peso vivo por uma hora, observou-se alterações no perfil do EEG, após o processamento do sinal digital.

Não se pode afirmar que nenhuma alteração foi promovida nos tecidos avaliados, já que a indução da transcrição gênica das enzimas de interesse nesse trabalho não foi avaliada, como fizeram Yu et al. (2008). Esses autores verificaram que ocorreu maior aumento na expressão dos genes das enzimas superóxido dismutase (*Sod1*, *Sod2* e *Sod3*) e catalase (*Cat*) no músculo sóleo que músculo vasto lateral de camundongo, após 12 horas da administração de endotoxina. Contudo, os métodos espectrofotométricos para avaliar a atividade das enzimas antioxidantes, como os utilizados nesse trabalho, são mais baratos que as técnicas de biologia molecular e permitem observar a atividade do produto gênico, ou seja, da enzima específica.

Nos músculos, o aumento na atividade das enzimas antioxidantes promoveria um aporte de proteção contra o estresse oxidativo gerado com a atividade muscular.

Músculos de metabolismo oxidativo como o sóleo seriam beneficiados por agentes antioxidantes, pois apresentam uma demanda aumentada de consumo de O_2 .

Contudo, o aumento do aporte antioxidativo parece ocorrer sob estímulos mais específicos, como o estresse induzido por restrição de movimento, diminuição de temperatura ambiente e protocolos de atividade física. No presente trabalho, o animais foram mantidos em gaiolas coletivas (4 animais por gaiola) durante o período de tratamento e em sala climatizada, a fim de minimizar as interferências ambientais sobre eles. Tem sido sugerido que o aumento na atividade das enzimas antioxidantes promovida pelo ácido indol-3-acético acontece quando é aplicado um desafio ao sistema biológico, como a indução da lesão hepática promovida pelo DEN (MOURÃO, 2008). Além disso, na presença de peroxidase, o AIA apresenta efeito oxidante (De MELO et al., 2004)

Prada et al. (2004) observaram redução na atividade das enzimas GR e CAT no plasma de ratos submetidos ao protocolo de treinamento (natação) que ocorreu, provavelmente, devido ao maior ataque oxidativo sofrido por esses animais já que os valores de TBARs apresentaram elevados nesse grupo.

O cérebro é bastante vulnerável a diferentes estressores. Sua sensibilidade para desenvolver degeneração é devido, principalmente, a presença de grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados que são alvo para o ataque de EROs (GUTTERIDGE, 1995) e a atividade de enzimas antioxidantes tem papel importante para prevenir lesões oxidativas. Sahin e Gümüslü (2004) verificaram que ratos que foram mantidos imobilizados ou em ambiente frio apresentaram aumento na atividade das enzimas SOD-Cu,Zn e CAT e no nível de TBARs no cérebro. No presente trabalho, nenhuma das doses de AIA administrada promoveu aumento do TBARs no cérebro e assim, não deve ter produzido alterações lesivas nessa

estrutura. A atividade das enzimas antioxidantes GR, CAT e SOD também não foi alterada nos ratos tratados com AIA em relação o controle. Esses resultados sugerem que as alterações observadas no perfil do EEG dos animais tratados com 40 mg/Kg de peso vivo não foram decorrentes de danos celulares, mas deve ter sido provocada por alterações fisiológicas. Não foram observadas mudanças comportamentais nos animais tratados com AIA, como irritabilidade, fraqueza nas patas e miotonia (FULLER et al., 1971), lassitude e imobilidade (JOHN et al., 1979) observada por outros autores.

A dose de escolha para se investigar os efeitos do AIA sobre a atividade elétrica encefálica promoveu alterações mais específicas sobre o funcionamento do sistema nervoso do que nos outros sistemas estudados nesse trabalho. O sistema nervoso responde mais rapidamente aos estímulos que são aplicados no organismo, fato que justifica a investigação da cinética de ação de substâncias através das respostas cerebrais, como a atividade elétrica.

Existem várias técnicas para avaliar o aumento ou a diminuição da atividade cerebral como a tomografia por emissão de pósitrons (TEP), ressonância magnética funcional (RMf), medidas da atividade magnética cerebral (Magnetoencefalografia - MEG) e medidas da atividade elétrica cerebral (Eletroencefalografia - EEG). A vantagem do monitoramento da atividade elétrica cerebral através do EEG está principalmente no baixo custo dos procedimentos e na possibilidade de se utilizar ferramentas matemáticas para se retirar um maior número de informações do sinal obtido. Nesse sentido, um método bastante simples de captação não invasivo de EEG para ratos foi desenvolvido nesse trabalho e permitiu captar o EEG de animais acordados, sem a necessidade de procedimentos cirúrgicos para a implantação dos eletrodos e utilizando apenas um canal (dois eletrodos).

O sinal elétrico cerebral possui amplitudes reduzidas e os dados obtidos podem ser prejudicados pela movimentação do animal. Por este motivo, a escolha do ponto para posicionamento dos eletrodos é de grande importância para a qualidade do sinal adquirido. Nesse sentido, a sensibilidade do equipamento de coleta do sinal elétrico encefálico é fundamental para permitir o uso de eletrodos acoplados na superfície da cabeça do animal, como acontece em humanos.

Para o EEG em ratos, não há um sistema padronizado de posicionamento dos eletrodos. Pode-se verificar na literatura que os eletrodos são implantados em várias posições no crânio ou em regiões específicas do cérebro. No presente trabalho, pode-se verificar que o EEG obtido de eletrodos colados na pele da cabeça permitiu coletar o EEG durante uma hora para cada tratamento e a análise do sinal elétrico obtido possibilitou retirar vários trechos de 3 segundos (mínimo de 32 trechos).

O ácido indol-3-acético na dose de 40 mg/Kg de peso vivo deve ter promovido alterações na dinâmica de disparo dos neurônios, aumentando a atividade elétrica de neurônios ou conjunto de neurônios que disparam sincronicamente nas frequências entre 8 a 30 Hz, pois foram observadas aumento na energia das bandas de frequência alfa e beta, em relação ao estado normal ou após a administração de PBS.

lhmsen et al. (2008) verificaram que anestésicos voláteis como o desflurano, isoflurano e sevoflurano promovem modificações na frequência média observada no EEG dos ratos durante o tempo de anestesia, que são observadas devido a presença de componentes tipo *spikes* (componentes de alta frequência) que são abruptas despolarizações sincrônicas de um grande número de neurônios piramidais. O perfil do EEG dos animais tratados com AIA e triptofano não

apresentaram essa componente e as modificações produzidas por essas substâncias só puderam ser observadas após processamento do sinal digital.

O triptofano foi utilizado nesse trabalho como critério de comparação. Pode-se observar que essas duas substâncias produziram efeitos diferentes no perfil do EEG dos animais. O triptofano (40 mg/Kg de peso vivo) diminuiu a energia das bandas de frequência beta e teta e aumentou a energia da banda delta, enquanto o AIA promoveu um aumento na energia das bandas de frequência alfa e beta. Esses resultados permitem sugerir que o triptofano promoveu alterações no sentido de reduzir a atividade elétrica cerebral, enquanto o AIA promoveu alterações no sentido de aumentar a atividade elétrica. Os efeitos do triptofano no perfil do EEG foram similares ao observado por Radek, Decker e Jarvis (2004) para a droga ABT-702 que promoveu aumento nas frequências entre 1-4 Hz similar ou observado durante o sono.

A diferença estatística observada nos tratamentos com AIA e triptofano em relação a condição normal e PBS, apesar de discreta, foi significativa e os dados foram validados no teste de *bootstrap* que reamostrou os valores da energia das bandas de frequência estudadas em 1000 vezes. Contudo, experimentos posteriores devem ser realizados para verificar numa dimensão temporal, em que momento, após o tratamento, ocorrem as modificações no EEG.

Apesar de não ter sido observado alteração na atividade específica das enzimas antioxidantes nos ratos tratados com ácido indol-3-acético, pode-se postular que em animais submetidos a agentes estressores como o aquecimento corporal, o manejo, o pastoreio e outros, o AIA desencadeia efeitos antioxidantes e assim melhorar a qualidade de vida desses animais. Ficou esclarecido que o AIA

não apresentou efeitos proxidantes nos músculos sóleo e gastrocnêmio o no cérebro dos animais.

Os resultados do EEG não permitem afirmar que o AIA tenha promovido alterações na síntese de serotonina, mas permitem afirmar que a atividade elétrica cerebral altera-se após sua administração. Os mecanismos envolvidos nessas respostas merecem ser investigado futuramente.

7 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que:

- O AIA nas doses administradas não alterou o perfil oxidativo nos músculos sóleo e gastrocnêmio e no cérebro dos ratos, pois:
 - as atividades das enzimas antioxidantes glutathione redutase, catalase e superóxido dismutase não estiveram alteradas em relação ao controle.
- O AIA nas doses administradas não promoveu alteração no metabolismo da glicose nos os músculos sóleo e gastrocnêmio dos ratos, pois:
 - a atividade das enzimas hexoquinase, lactato desidrogenase e glicose-6-fosfato desidrogenase não foi alterada em relação ao controle.
- O AIA nas doses administradas não promoveu ação oxidante sobre o tecido nervoso, pois:
 - não houve aumento nos valores de TBARs em relação ao controle.
- O método não invasivo de captação de EEG desenvolvido para ratos permitiu adquirir e analisar o sinal elétrico cerebral.
- O AIA na dose de 40 mg/Kg de peso vivo alterou o padrão do EEG do animal pois a energia das frequências de ondas alfa (8-12 Hz) e beta (12-30 Hz) foi maior em relação ao estado normal e após administração de tampão fosfato.

Essas alterações foram diferentes da observada após tratamento com triptofano.

Pode-se concluir que o ácido indol-3-acético, apesar de não ter alterado a atividade de enzimas relacionadas com o metabolismo celular, modifica a atividade elétrica cerebral.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, D.U. AND NAM, K.C. Effects of ascorbic acid and antioxidants on color, lipid oxidation and volatiles of irradiated ground beef. **Radiation Physics and Chemistry** v. 71, n. 1-2, p.151-156, 2004.

ANDERSON, G.M.; GERNER, R.H.; COHEN, D.J.; FAIRBANKS, L. Central tryptamine turnover I depression, schizophrenia and anorexia: measurement of indoleacetic acid in cerebrospinal fluid. **Biol. Psychol**, v. 19. p. 1427-1435, 1984.

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

ARCE, A.I.C **Redes de sensores sem fio na coleta de dados fisiológicos de bovinos para aplicações na zootecnia de precisão**. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

ARMSTRONG, M.D.; ROBINSON, K.S. On the excretion of indole derivatives in phenylketonuria. **Archives. Biochemistry and. Biophysics**., v. 52; p. 287- 288, 1954.

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

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

BEEHLER, C.J. et al. Blood sulfhydryl level increases during hyperoxia: a marker of oxidant lung injury. **Journal of Applied Physiology**, v.67, p.1070-1075, 1989.

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

BEKHIT, A. E. D.; ILIAN, M. A.; MORTON, J. D.; VANHANAN, L.; SEDCOLE J. R.; BICKERSTAFFE, R. Effect of calcium chloride, zinc chloride, and water infusion on metmyoglobin reducing activity and fresh lamb color. **American Society of Animal Science**

BERGMAYER, H.U.; BERNT, H., MOLLERING, E.R. Measurement of glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: **Methods in Enzymatic Analysis**, BERGMAYER, H.U. (Ed.). Methods of Enzymatic Analysis London: Academic Press, New York, N.Y., 1974, pp. 134.

BERGMEYER, H.U.; BERNT, E.; HESS, B. Lactic dehydrogenase. In: **Methods in Enzymatic Analysis**, BERGMEYER, H.U. (Ed), Academic Press, New York, N.Y., 1965, pp. 737.

BERTILSSON, L; OALMER, L. Indole-3-acetic acid in human cerebrospinal fluid: identificaition and quantification by mass espectrography. **Science**, v.117, p.74-76, 1972.

BO, P.; SORAGNA, D.; SPECCHIA, C.; CHIMENTO, P.; FAVALLI, L. Quantified EEG analysis monitoring in a novel model of general anaesthesia in rats. **Brain Research Protocols**, v. 11, p. 155-161, 2003.

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

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

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

BROCKWAY, B.P.; HASSLER, C.R. Aplication of radiotelemetry to cardiovascular measurements in pharmacology and toxicology. In: SALEM, H.; BASKEN, S.I. (Ed.). **New technologies and concepts for reducing drug toxities**. Boca Raton: CRC Press, c1993. p.109-132.

BRUNETTI, I.L.; FARIA-OLIVEIRA, O.M.M. Sistemas quimiluminescentes com peroxidase (EC:1.11.1.7) e suas aplicações em análise clínicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 16, p. 55-77, 1995.

BUEGE J.A., AUST S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 108, p.302-305, 1978.

CAMPA, A. Biological roles of plant perosidase: known and potential function. In: EVERSE, J.; EVERSE, K.E.; CRISHAM, M.B. eds **Peroxidases in chemistry and biology**. Boca Raton, CRC press, v. 2, p. 25-50, 1991.

CANDEIAS, L.P.; FOLKES, L.K.; DENNIS, M.F.; PATEL, K.B.; EVERETT, S.A. STRATFORD, M.R.L.; WARDMAN, P. Free radical intermediates and stable products in the oxidation of indole-3-acetic acid. **Journal of Physical Chemistry**, v. 98, p.10131-10137, 1994.

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

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

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

CARDOSO, L.M.; COLOMBARI, D.S.A.; MENANI, J.V.; DE PAULA, P.M.; CHIANCA-JR, D.A.; COLOMBARI, E. Espécies reativos do oxigênio no controle neurovegetativo da pressão arterial. *Medicina*, Ribeirão Preto, X Simpósio Brasileiro de fisiologia Cardiovascular, v. 39, n.1, p. 77-88, 2006.

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

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

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

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

COSTA, E.J.X. **Interface cérebro-computador usando redes neurais artificiais e técnicas avançadas de processamento digital de sinais**. 2000. 216 f. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

COSTA, E.J.X. **Estudo da atividade elétrica cerebral em humanos e bovinos usando processamento digital de sinais e instrumentação eletrônica**. 2005. 92 f. Tese (Livre-docência) – - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

COSTA, E.J.X.; CABRAL, E.F. Short time fractal dimension for EEG signal processing in brain-computer interface. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SIGNAL PROCESSING APPLICATION AND TECHNOLOGY, 2000, Dallas. **Proceedings**. Dallas: CMP Media Inc., 2000. CD-ROM.

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

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

DAUBECHIE, I. **Ten lectures on “wavelet”s**. Philadelphia: CBMS Lectures notes series - SIAM, 1992.

DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. IN: DAVIES, P.J. eds. **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht, Kluwer academic publishers, p. 1-10, 1988.

DE MELO, M. P.; LIMA, T. M.; PHITON-CURI, T. C. P.; CURI, R. The mechanism of indole acetic acid cytotoxicity. **Toxicology Letters**, v.148, p.103-111, 2004.

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

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

DIMPFEL, W. Pharmacological modulation of cholinergic brain activity and its reflection in special EEG frequency ranges from various brain areas in the freely moving rat (Tele-Stereo-EEG). **European Neuropsychopharmacology**, v. 15, p. 673-682, 2005.

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

DRINGENBERG, H.C.; DIAVOLITSIS, P. Eletroencephalographic activation by fluoxetine in rats: role of 5-HT_{1A} receptors and enhancement of concurrent acetylcholinesterase inhibitor treatment. **Neuropharmacology**, n. 42, p. 154-161, 2002.

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

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

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

DUBOWITZ, V. **Muscle Biopsy: A practical approach**. 2nd ed., London, Baillière Tindall, 1985, 720 p.

ESBÈRARD, C. A. O Músculo. In: AIRES, M.M. (ed) **Fisiologia**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, ed, , p. 60-189, 1991.

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

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

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

FERREIRA, M. S. L.; OLIVEIRA, D. L.; LINS, P. G.; PUGINE, S. M. P.; SILVA, G. S.; COSTA, E. J. X.; DE MELO, M. P. Efeito do metabolismo do triptofano sobre a capacidade fagocitária em neutrófilos. **Brazilian Journal of Food and Techonology**, v.III, p.65-70, 2006.

FOLKES, L. K.; DENNIS, M. F.; STRATFORD, M. R. I. CANDEIAS, L. P. WARDMAN, P. Peroxidase-catalyzed effects of indole-3-acetic acid and analogues on lipid membrane, DNA, and mammalian cell in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v.57, p.375-382, 1999.

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

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

FULLER, R. W.; LACEFIEL, W. B.; KATTAU, R. W.; NICKANDER, R. C.; SNODDY, H.D. Myotonia produced by indoleacetic acid: studies with related compounds and correlation with drug levels in tissues. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v.193, p.48-60, 1971.

GACSALYI, U.; ZABIELSKI, R.; PIERZYNOWSKI, S.G. Telemetry facilitates long-term recording of gastrointestinal myoelectrical activity in pigs. **Experimental Physiology**, New York, v.85, n.2, p.239-241, 2000.

GOLDFARB, A.H. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. Indianapolis, v.25, n.2, p.232-236, 1993.

GONDRET, F.; DAMONI, M.; JADHAO, S.B.; HOUEBINE, M.L.; HERPIN, P.; HOCQUETTE, J.F. Age-related changes on glucose utilization and fatty acid oxidation in a muscle-specific manner during rabbit growth. **Journal of muscle Research and Cell Motility**, n. 25, p. 405-410, 2004.

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

GRECO, O; FOLKES, L. K.; WARDMAN, P.; TOZER, G. M. DACHS, G. U. Development of a novel enzyme/product combination for gene therapy of cancer: horserandish peroxidase/indole-3-acetic acid. **Cancer Gene Therapy**, v.7, p.1414-1420, 2000.

GUTTTERIDGE, J.M. Lipidic peroxidation and antioxidant as biomarkers of tissue damage. **Clin. Chem**, n. 41, p. 1819-28, 1995.

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

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

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

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

HASHIDA, J.C.; SILVA, A.C.S.; SOUTO, S.; COSTA, E.J.X. EEG pattern discrimination between salty and sweet taste using adaptative Gabor transform. **Neurocomputing**, v. 68, p. 251-257, 2005.

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

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

IHMSEN, H.; CHYWALSKY, M.;PLETTKE, R.; PRILLER, M.; WALZ, F.; SCHWILDEN, H.; Concentration-effect relations, prediction probabilities (Pk) and signal-to-noise ratios of different electroencephalographic parameters during administration of desclurane, isoflurane, and sevoflurane in rats. **Anesthesiology**, v. 108, p. 276-285, 2008.

JASPER, H.H. The ten-twenty electrode system of the international federation. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, Limerick, v.10, n.2, p.371-375, 1958.

JEPSON, J.B. Indolylacetyl-glutamine and other indole metabolites in Hartnup disease. **Biochem. J.**, v. 64, p. 14, 1959.

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

JOHN, J. A.; BLOGG, C. D.; MURRAY, F. J.; SCHWETZ, B. A.; GEHRING, P.J. Teratogenic effect of the plant hormone indole-3-acetic acid in mice and rats. **Teratology**, v.19, p.321-326, 1979.

JONES, S.; ABDALLA, D. S. P.; FREITAS, J. C. Effects of indole-3-acetic acid on cróton oilinduced and arachidonic acid-induced mouse ear edema. **Inflammation Research**, v.44, p.372-375, 1995.

KABORI, K.; SAKAKIBARA, H.; MARUYAMA, K.; KOBAYAXHI, T.; YAMAKI, T. A rapid method for determination urinary indoleacetic acid concentration and its clinical significance as the tumor marker in the diagnosis of malignat diseases. **J. Uoeh**, v. 5; p. 213-220, 1983.

KASHIF, S.M.; ZAIDI, R., BANU, N. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulanting oxidative stress in rat brain. **Clinica Chimica Acta**, v. 340, p. 229-233, 2004

KELLY, A. M.; RUBINSTEIN, N.A. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: ENGEL, A.G., FRANZINI-ARMSTRONG, C. (eds) **Myology**. New York, McGraw-Hill, p. 119-131, 1994.

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

KOGL, R.; HAGEN-SMITH, A. J.; ERXLEBEN, H. Vegetable growth substances, a phytohormones of cell extension. Purification of auxin from human urine. **Journal of Physical Chemistry**, v.214, p.241-246, 1933.

KOHEN R, NYSKA A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena antioxidants redox reactions and methods for their quantification. **Toxicology and Pathology**, v. 30, p. 620-50, 2002.

KOTAGAL, P.;YARDI, N. The Relationship Between Sleep and Epilepsy. **Seminars in Pediatric Neurology**, v 15, n.2, p. 42-49, 2008.

KOZMA R., FREEMAN W. J., Classification of EEG patterns using nonlinear dynamics and identifying chaotic phase transitions. **Neurocomputing**, v.44, p.1107-1112, 2002.

KOZMA R., FREEMAN W. J., Classification of EEG patterns using nonlinear dynamics and identifying chaotic phase transitions. **Neurocomputing**, v.44, p.1107-1112, 2002.

KRUK, Z.L.; PICOCK, C.J. **Neurotransmitters and Drugs**, 2 ed. London, Croom Helm, 1983.

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

LAPRAY, D.; BERGELER, J.; DUPONT, E.; THEWS, O.; LUHMANN, H.J. A novel miniature telemetric system for recording EEG activity in freely moving rats. **Journal of Neuroscience Methods**, n. 168, p.119-126, 2008.

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

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

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

MACKENZIE, D.Y.; WOOLF, L.I. "Maple syrup urine disease" and inborn error of the metabolism of valine, leucine, and isoleucine associated with gross mental deficiency. **Br. Med. J.**, v. 90, p. 90-91, 1959.

MARCHANT, B.P. Time-frequency analysis for biosystems engineering. **Biosystems Engineering**, San Diego, v.85, n.3, p.261-281, 2003.

MARTÍNEZ, E.; ARTIGAS, F.; SUÑOL, C.; TUSSEL, J. M.; GELPÍ, E. Liquid-chromatographic determination of indole-3-acetic acid and 5-hydroxy-indole-3-acetic acid in human plasma. **Clinical Chemistry**, v.29, P.1354-1357, 1993.

MELO, P.A.; OWNBY, C.L. Different sensitivity of fast- and slow-twitch muscles to some snake venoms and myotoxins. **Toxicon**, v. 34, n.6, p. 653-669, 1996.

MELLO FILHO, A.; HOFFMAN, M.E.; MENEHINI, L.J. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intra-cellular iron. **Biochem. J.**, n.218, p. 273-5, 1983.

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

MIRSKY, I. A.; DIENGOTT, D. Hypoglycemic action of indole-3-acetic acid by mouth in patients with diabetes mellitus. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 93, p. 109-110, 1956.

MOHAMMED, N., ONODERA, R., OR-RASHID, M.M. Degradation of tryptophan and related indolic compounds by ruminal bacteria, protozoa and their mixture in vitro. **Biochem. & Mol.Biol.**, 24(1-2): 73-80, 2003.

MORINI, C.C.; PEREIRA, E.C.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; OWNBY, C.L.; SALVINI, T.F. Injury and recovery of fast and slow skeletal muscle fibers affected by ACL myotoxin isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 1007-1024, 1998.

MOTTA, V.T. **Bioquímica**. Editora: EDUCS, 332 p., 2005.

MOURÃO, L.R.M.B. **Efeito antioxidante do ácido indol-3-acético sobre fígados de camundongos submetidos a hepatocarcinogênese induzida**. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

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

OGATA, T. Structure of motor endplates in the different fiber types of vertebrate skeletal muscles. **Arch. Histol. Cytol.**, v 51, n.5, p.385-424, 1988.

OKADA, Y.; KANEKO, M.; OKAJIMA, H. Hydroxyl radical scavenging activity of naturally occurring furan fatty acids. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v.19, n.12, p.1607-1610, 1996.

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

OLSSON, J.; CLAESON, K.; KARLBERG, B.; NORDSTROM, A. Determination of indole-3-acetic acid and indole-3-acetylaspatic acid in pea plant with capillary electrophoresis and fluorescence detection. **Journal of Chromatography**, v.824, p.231-239, 1998.

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

PLAČEK, V.; SVOBODOVÁ, V.; BARTONÍČEK, B.; ROSMUS, J.; ČAMRA, M. Shelf-stable food through high dose irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 71, n. 1-2, p. 515-518, 2004.

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

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

POWERS, S.K.I.; CRISWELL, D.; LAWER, J. JI, L.L.; MARTIN, D.; HERB, R.A. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 266, p. R375-R380, 1994.

PRADA, F.J.A.; VOLTARELLI, F.A.; OLIVEIRA, C.A.M.; GOBATO, C.A.; MACEDO, D.V.; MELLO, M.A.R. Condicionamento aeróbico e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbico. *Revista Brasileira Ciência e Movimento*, v. 12, n. 2, p.29-34, 2004.

PROAKIS, J.G.; MANOLAKIS, D.G. **Digital signal processing: principles, algorithms, and applications**. 3rd ed. New Delhi: Prentice-Hall, 2002.

PUGINE, S.M.P.; BRITO, P.P.; ALBA-LOUREIRO, T.C.; COSTA, E.J.X.; CURI, R.; DE MELO, M.P. Effect of indole3-acetic acid administration by gavage and by subcutaneous injection on rat leukocytes. **Cell Biochemistry and Function**, N. 25, P. 723-730, 2007.

QIAN, S. **Introduction to time-frequency and “wavelet”s transforms**. New Jersey: Prentice-Hall, 2002.

QIAN, S.; CHEN, D. **Joint time-frequency analysis: methods and aplications**. Upper Saddle River: PTR Prentice Hall, 1996.

RADEK, R.J.; DECKER, M.W.; JARVIS, M.F. The adenosine Kinase inhibitor ABT-702 augments EEG slow waves in rats. **Brain Research**, n. 1026, p. 74-83, 2004.

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

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

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

SAHIN, E. GÜMÜSLÜ, S. Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. **Behavioural Brain Research**, N. 155, P. 241-248, 2004.

SALLES, M.G.F. Água de codo (*Cocus nucifera* L.) in natura, sob a forma de gel e estabilizada como diluidor do sêmem de caprino. Porto Alegre, 1989. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1989.

SCALLET, A.C.; KOWALKE, P.K.; ROUNTREE, R.L.; THORN, B.T.; BINIENDA, Z.K. Electroencphalographic, behavioral, and c-fos responses to acute domoic acid exposure. **Neurotoxicology and Teratology**, n. 26, p. 331-342, 2004.

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

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

SILVA, A.C.S. **Aplicação de técnicas de processamento digital de sinais na caracterização de sinais cerebrais de bovinos**. 2005. 106 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

SINNA, G.A. The effect of the plant hormone indole-3-acetic acid and chemically related-compounds on the growth of mouse fibroblast 3T3-cells. **Comparative Biochemistry and Physiology. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v.74, p.433-436, 1983.

SMOLKA, M.; ZOPPI, C.C.; ALVES, A.A.; SILVEIRA, L.R.; MARANGONI, S.; PEREIRA DA SILVA, L. HSP-72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle rats. **American Journal of Physiology Regulatory Integrate and Comparative Physiology**, v. 279, p. E1539-E1545, 2000.

STEIN, J.M.; PADYKULA, H.A. Histochemical classification of individual muscle fibers on the rat. **Am. J. Anat.**, v. 110, p. 103-105, 1962.

SULLIVAN, W. T.; STRONG, L. M. Behavioral changes in rats and guinea pigs induces by the administration of indole-3-acetic acid and 6-aminonicotinamide. **Journal of Nutrition**, v.65, p.199-209, 1958.

TONIOLLI, R.; BUSSIÈRE, J.; COUROT, M.; COMBARNOUS, Y. Effect of indole-3-acetic acid (plant auxin) on boar sperm mobility and pregnancy and prolificacy rates after freezing and thawing. **Reproduction in Domestic Animals**, v.33, p.33-38, 1998.

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

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

VÁLIO, I.F.M. Auxinas. In: FERRI, M.G. ed **Fisiologia Vegetal 2**, São Paulo, EPU, p. 39-72, 1986.

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

XU, J.; ZHENG, C.; LIU, X.; PEI, X.; JING, G. Detecting brain activity variation of rats during anesthesia by spectral entropy. IEEE proceedings of the 27th Annual Conference Engeneerin in Medicine and Biology 2005, Shanghai, p 1-4, 2005

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

WILSON, J.E. Rapid purification of mitochondrial hexokinase from rat brain by a single affinity chromatography step on Affi-Gel blue. **Preparative Biochemistry**, v. 19, p.13-21, 1989.

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

YU, ZENGLI, LI, PING, ZHANG, M, HANNINK, M., STAMLER, J.S., YAN, Z. Fiber type-specific nitric oxide protects oxidative myofibers against cachectic stimuli. **Skeletal Muscle Wasting**, v. 3, p 1-10, 2008.

ANEXO 1 - Parecer da Comissão de Ética Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, referente ao projeto envolvendo ratos e iniciado em 2005 na FZEA.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciências Básicas

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o projeto intitulado de "**Influência da Administração de Ácido Indol-3-Acético sobre a Função e o Metabolismo Celular em Ratos**" sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mariza Pires de Melo está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

Pirassununga, 10 de setembro de 2004.

Prof. Dr. Antonio Joaquim Rossini
Comissão de Ética Animal da FZEA

ANEXO 2 – Algoritmo desenvolvido no software MATLAB® para o processamento de EEG de ratos adquiridos por método não invasivo desenvolvido no presente trabalho.

```

selectiontype = get(gcf,'SelectionType')
s = handles.CData
size(s)
sinal=s;
    value = get(handles.listbox1, 'Value');
    Fs=str2num(get(handles.edit3,'String'));
    e=size(s)
    t = (1:e(1))/Fs;
    w = (0:255)/256*(Fs/2);
    if value == 1%filtra alfa
        [b,a] = ellip(4,0.1,20,[8 12]*2/Fs);
        sf = filter(b,a,sinal);
        plot(t,sf);
        xlabel('Tempo (segundos)');
        ylabel('sinal');
        %axis([0 1 -1 1]);
        energia=norm(sf)
        ener=num2str(energia);
        set(handles.edit4,'String',ener);
    end
    if value == 2%filtra beta
        [b,a] = ellip(4,0.1,20,[12 30]*2/Fs);
        sf = filter(b,a,sinal);
        plot(t,sf);
        xlabel('Tempo (segundos)');
        ylabel('sinal');
        %axis([0 1 -1 1]);
        energia=norm(sf)
        ener=num2str(energia);
        set(handles.edit4,'String',ener);
    end
    if value == 3%filtra delta
        [b,a] = ellip(4,0.1,20,[.3 4]*2/Fs);
        sf = filter(b,a,sinal);
        plot(t,sf);
        xlabel('Tempo (segundos)');
        ylabel('sinal');
        %axis([0 1 -1 1]);
        energia=norm(sf)
        ener=num2str(energia);
        set(handles.edit4,'String',ener);
    end
    if value == 4%filtra teta
        [b,a] = ellip(4,0.1,20,[4 8]*2/Fs);
        sf = filter(b,a,sinal);
        plot(t,sf);
        xlabel('Tempo (segundos)');
        ylabel('sinal');
        %axis([0 1 -1 1]);
        energia=norm(sf)
        ener=num2str(energia);
        set(handles.edit4,'String',ener);
    end

```

ANEXO 3 - Algoritmo desenvolvido no software MATLAB® para o teste de *bootstrap* do EEG de ratos adquiridos por método não invasivo desenvolvido no presente trabalho

```

pstring=varargin;
if (exist('B2')~=1), B2=25; end;
if (exist('B1')~=1), B1=99; end;
if (exist('alpha')~=1), alpha=0.05; end;
if (exist('type')~=1), type=1; end;
if (exist('vzero')~=1),
    error('Provide the value of the parameter under the null hypothesis');
end;

x=x(:);
vhat=feval(statfun,x,pstring{:});
bstat=bootstrp(B2,statfun,x,pstring{:});

if type==1,
    T=abs(vhat-vzero)/std(bstat);
else
    T=(vhat-vzero)/std(bstat);
end;

[vhatstar,ind]=bootstrp(B1,statfun,x,pstring{:});
bstats=bootstrp(B2,statfun,x(ind),pstring{:});

M=(B1+1)*(1-alpha);
M = round(M);
type
if type==1,
    tvec=abs(vhatstar-vhat)/std(bstats)';
    st=sort(tvec);

    if T>st(M), H=1; else H=0; end;
elseif type==2,
    tvec=(vhatstar-vhat)/std(bstats)';
    st=sort(tvec);
    if T>st(M), H=1; else H=0; end;
elseif type==3,
    tvec=(vhatstar-vhat)/std(bstats)';
    st=sort(tvec);
    if T<st(M), H=1; else H=0; end;

end;

```