

RENATA CELI LOPES TOLEDO

AVALIAÇÃO DA INGESTÃO AGUDA E CRÔNICA DA POLPA DE MANGA
UBÁ (*Mangifera indica* L.) NA HOMEOSTASE SÉRICA, NA EXPRESSÃO
DA HSP 70 E NA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM RATOS.

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica Agrícola, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

T649a
2010
Toledo, Renata Celi Lopes, 1978-
Avaliação da ingestão aguda e crônica da polpa de manga
Ubá (*Mangifera indica* L.) na homeostase sérica, na
expressão da HSP 70 e na atividade da superóxido dismutase
em ratos / Renata Celi Lopes Toledo. – Viçosa, MG, 2010.
xvi, 75f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: José Humberto de Queiroz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 60-71

1. Stress oxidativo. 2. Manga. 3. *Mangifera indica*.
 4. Polpa de frutas. 5. Superóxido dismutase.
 6. Proteínas. 7. Antioxidantes. 8. Ensaio biológicos.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 572

RENATA CELI LOPES TOLEDO

AVALIAÇÃO DA INGESTÃO AGUDA E CRÔNICA DA POLPA DE MANGA
UBÁ (*Mangifera indica* L.) NA HOMEOSTASE SÉRICA, NA EXPRESSÃO
DA HSP 70 E NA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM RATOS.

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica Agrícola, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de Julho de 2010.

Profª. Sônia Machado Rocha Ribeiro
(Coorientadora)

Profª. Maria do Carmo Gouveia Pelúzio
(Coorientadora)

Prof. Luciano Gomes Fietto

Profª Juliana Rocha Soares Lopes Ramos

Prof. José Humberto de Queiroz
(Orientador)

Agradeço a Deus por ser fonte inesgotável de luz que ilumina e guia todos os meus passos, por ter sido sustentação nestes anos de estudo e ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho facilitando a realização desta conquista.

Tudo que sou e que tenho são para ti Senhor.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola pela oportunidade de realização deste curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa em Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro ao projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio de bolsa de estudo no último período do curso.

Ao meu orientador, José Humberto de Queiroz, por acreditar no meu esforço e trabalho e, sobretudo pela amizade construída durante essa caminhada.

À Professora Sônia Machado Rocha Ribeiro pela abertura da linha de pesquisa seguida por este trabalho, assim como pelo incentivo, ensinamentos, e, sobretudo pelo carinho e disponibilidade em ajudar sempre.

À Professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio pelo apoio, sugestões e carinho demonstrados sempre que precisei da sua ajuda.

À Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes pelo apoio, incentivo, confiança, e, sobretudo pelo aprendizado adquirido durante os três anos em que trabalhei sob a sua supervisão. Com certeza você foi fundamental nesta conquista. Muito obrigada por tudo.

À Professora Márcia Rogéria de Almeida por ter aceitado participar do projeto e por ter disponibilizado o Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) para a realização do RT-PCR em Tempo Real.

Ao Professor Cláudio Lisias Mafra de Siqueira, por ter aceitado ser integrante da equipe que escolhemos para realização deste projeto.

Ao Professor Luciano Gomes Fietto pela atenção e disponibilidade de ajudar nos momentos em que precisei

À Professora Juliana Rocha Soares Lopes Ramos por ter sempre me recebido com muito carinho e atenção nas visitas inesperadas em sua sala.

À Professora Andréia de Oliveira Barros Ribon pelo apoio e por ter disponibilizado o Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM) para a realização de alguns experimentos.

À Professora Maria Cristina Baracat Pereira e a todos os integrantes do Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas pelos anos de harmonioso convívio.

À Professora Hércia Stampine Duarte Martino do Departamento de Nutrição e Saúde por ter disponibilizado o Laboratório de Nutrição Experimental para a realização do ensaio biológico.

Aos meus pais, Penha Lopes Toledo e José de Queiroz Toledo, por sempre me apoiarem, dando suporte afetivo e financeiro para a realização dos meus sonhos. Vocês são responsáveis por esta conquista.

Aos meus irmãos pelo apoio e incentivo, em especial a Raquel que superou o repúdio a ratos e me ajudou nesta parte do experimento.

Ao meu sobrinho, Pedro, pelas alegrias e distrações tornando mais confortáveis os momentos de dificuldades.

Aos colegas do Laboratório de Fermentação e Metabolismo, Bruna, Felipe, Fernando, Hugo e Wilton pelo convívio agradável em todos os momentos.

À minha amiga Larissa, que apesar de trabalhar e estudar muito, esteve sempre disponível para ajudar, apoiar e incentivar quando precisei. É muito

bom conviver com pessoas como você, divertida, generosa e, sobretudo amiga para todas as horas.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas pelo prazeroso convívio durante os três anos de trabalho. Agradeço em especial ao Pedro Augusto pelos ensinamentos e por ter me ajudado sempre com muita atenção e paciência.

Ao Raphael, integrante do LBM, pela imensa vontade de ajudar, pela atenção, ensinamentos e sugestões passados durante a realização dos experimentos. A sua ajuda na etapa final foi de fundamental importância para a realização deste trabalho. Muito obrigada.

À minha amiga Ritinha pelo apoio e incentivo, e por ser juntamente com o seu pai, José Fausto, os responsáveis pelo meu ingresso na UFV.

À Camila pelo apoio e ajuda fundamental durante todo o ensaio biológico, e, sobretudo pela amizade conquistada.

A todos os colegas de pós-graduação pelo convívio harmonioso durante esta caminhada.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial ao secretário da pós-graduação, Eduardo Pereira Monteiro, pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

A todos os meus amigos pelo apoio e incentivo durante esta jornada.

Enfim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada a todos!

BIOGRAFIA

RENATA CELI LOPES TOLEDO, filha de José de Queiroz Toledo e Penha Lopes Toledo, nasceu em 25 de novembro de 1978, na cidade de São Paulo, São Paulo.

Em março de 2002, iniciou o curso de graduação em Nutrição na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), em Ouro Preto, MG, concluindo-o em dezembro de 2006.

Em agosto de 2008, ingressou no Programa de Mestrado em Bioquímica Agrícola na UFV, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, em julho de 2010, com a defesa da dissertação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	
ix	
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ANEXO	
xii	
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Manga.....	4
2.2. Processos Oxidativos.....	6
2.3. Sistemas Antioxidantes.....	8
2.3.1. Defesas antioxidantes não-enzimáticas.....	9
2.3.2. Defesas antioxidantes enzimáticas.....	11
2.3.2.1. Superóxido dismutase.....	11
2.3.2.2. Catalase.....	11
2.3.2.3. Glutathione peroxidase.....	12
2.3.3. Mecanismo de reparo (<i>Heat Shock Proteins</i> – HSP 70).....	13
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo Geral.....	16
3.2. Objetivos Específicos.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1. Preparo da amostra.....	17
4.2. Preparo das dietas.....	17
4.3. Delineamento experimental.....	18
4.4. Parâmetros bioquímicos séricos.....	20
4.5. Parâmetros avaliados em homogeneizado de fígado.....	20
4.5.1. Quantificação de proteína.....	21
4.5.2. Determinação do estresse oxidativo: Determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	21
4.5.3. Mecanismo de Defesa do Organismo.....	22

4.5.3.1. Atividade da superóxido dismutase.....	22
4.5.3.2. Avaliação da Expressão da HSP 70.....	23
4.5.3.2.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).....	23
4.5.3.2.2. Análise por “Western Blotting”.....	23
4.5.3.2.3. Extração do RNA.....	24
4.5.3.2.3.1. Quantificação do RNA.....	25
4.5.3.2.3.2. Avaliação da pureza e integridade do RNA.....	25
4.5.3.2.4. Síntese de cDNA.....	26
4.5.3.2.5. Quantificação dos transcritos por transcrição reversa seguida de PCR em tempo real.....	26
4.6. Análise Estatística.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1. Consumo alimentar, peso corporal e índice hepatossomático.....	29
5.2. Parâmetros bioquímicos séricos.....	33
5.3. Avaliação da hepatotoxicidade e do estresse oxidativo.....	38
5.3.1. Enzimas relacionadas à integridade hepática.....	38
5.3.2. Peroxidação lipídica hepática.....	46
5.4. Mecanismo de Defesa Antioxidante de Ratos Tratados com Polpa de Manga Ubá.....	50
5.4.1. Atividade da superóxido dismutase.....	50
5.4.2. Expressão da Proteína HSP 70.....	52
5.4.2.1. Avaliação qualitativa da HSP 70 por western blotting.....	53
5.4.2.2. Expressão da proteína HSP 70 por RT-PCR em tempo real.....	54
6. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS.....	72

LISTA DE TABELAS

	Página
4. Consumo alimentar e peso corporal dos animais durante o período experimental de 24 horas.....	29
5. Consumo alimentar (g) dos animais durante o período experimental de 25 dias.....	29
6. Evolução semanal do peso corporal (g) dos animais do experimento de 25 dias.....	30
7. Níveis de colesterol total sérico (mg/dL) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.....	34
8. Níveis de HDL-c sérico (mg/dL) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.....	34
9. Níveis de triacilgliceróis sérico (mg/dL) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.....	36
10. Níveis de glicose sérica (mg/dL) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias sob jejum de 12 horas.....	37
11. Concentração sérica da aspartato aminotransferase (U/L) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.....	41
12. Concentração sérica da alanina aminotransferase (U/L) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.....	43
13. Concentrações séricas da gama-glutamilttransferase (U/L) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.....	44
14. Concentração de proteína total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de homogeneizado de fígado dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.....	47
15. Concentração de malondialdeído (nmol/mg de proteína) no homogeneizado de fígado dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.....	48
16. Atividade da superóxido dismutase hepática (U/mg de PTN) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.....	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
2. Ganho de peso corporal dos animais em 25 dias de experimento.....	30
3. Índice hepatossomático dos animais no experimento de 25 dias.....	32
4. Níveis de colesterol total sérico (mg/dL) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.....	34
5. Níveis de HDL-c sérico (mg/dL) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.....	35
6. Níveis de triacilglicerol sérico (mg/dL) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.....	36
7. Níveis de glicose sérica (mg/dL) dos animais nos experimentos 24 horas e 25 dias.....	37
8. Concentração sérica da aspartato aminotransferase (U/L) dos animais nos experimentos 24 horas e 25 dias.....	41
9. Concentração sérica da alanina aminotransferase (U/L) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.....	43
10. Concentração sérica da gama-glutamil aminotransferase (U/L) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.....	45
11. Concentração de malondialdeído (nmol/mg de proteína) em homogeneizado de fígado dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.....	49
12. Atividade da superóxido dismutase em homogeneizado de fígado dos animais nos experimentos 24 horas e 25 dias.....	51
13. Análise qualitativa da proteína HSP 70 dos animais no experimento de 24 horas: controle e manga 3% (A) e manga 10% e vitamina E (B).....	53
14. Análise qualitativa da proteína HSP 70 dos animais no experimento de 25 dias (A: controle e manga 3% e B: manga 10% e vitamina E).....	53

15. Gel de RNA extraído de fígado dos animais no experimento de 24 horas (A) e 25 dias (B).....	54
16. Curva padrão da eficiência da RT-PCR utilizando o gene alvo HSP 70....	55
17. Curva padrão da eficiência da RT-PCR utilizando o gene GAPDH.....	55
18. Expressão relativa da proteína HSP 70 dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias de acordo com os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtidos pela técnica de RT-qPCR.....	56

LISTA DE ANEXO

	Página
Anexo 1. Equivalência da concentração de polpa de manga na dieta experimental dos animais com a dieta humana.....	73
Figura 1. Curva padrão de proteína utilizando albumina sérica bovina, segundo o método de Bradford.....	73
Figura 2. Gel de proteína do fígado dos animais no experimento de 24 horas: (A: controle e manga 3% e B: manga 10%, vitamina E).....	74
Figura 3. Gel de proteína do fígado dos animais no experimento de 25 dias: (A: controle e manga 3% e B: manga 10%, vitamina E).....	74
Figura 4: Curvas de <i>melting</i> para os genes avaliados por RT-PCR em tempo real.....	75

RESUMO

TOLEDO, Renata Celi Lopes, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Avaliação da ingestão aguda e crônica da polpa de manga Ubá (*Mangifera indica* L.) na homeostase sérica, na expressão da HSP 70 e na atividade da superóxido dismutase em ratos.** Orientador: José Humberto de Queiroz. Co-Orientadores: Sônia Machado Rocha Ribeiro, Maria do Carmo Gouveia Peluzio, Márcia Rogéria de Almeida e Cláudio Lisias Mafra de Siqueira.

A manga (*Mangifera indica* L.) figura entre as frutas tropicais de maior expressão econômica nos mercados brasileiro e internacional. A variedade ubá é muito produtiva e bastante conhecida em algumas regiões do Brasil, sobretudo na Zona da Mata de Minas Gerais. Esta fruta se destaca por seu valor nutricional, sendo uma fonte rica de ácido ascórbico, carotenóides totais e compostos fenólicos, moléculas que apresentam grande potencial antioxidante no meio biológico. Estudos epidemiológicos têm mostrado evidências que antioxidantes presentes em frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a baixa incidência de doenças relacionadas a processos oxidativos. Este trabalho propôs avaliar o efeito da ingestão aguda e crônica de dietas suplementadas com 3% e 10% de polpa de manga Ubá na modulação de biomarcadores do sistema antioxidante endógeno (superóxido dismutase e HSP 70) e nos marcadores bioquímicos de estresse oxidativo (enzimas aminotransferase e malondialdeído), em ratos wistar saudáveis. Os resultados obtidos demonstraram que a ingestão de dietas suplementadas com 3% e 10% de polpa de manga interferiu sobre os marcadores de injúrias, uma vez que no experimento de 24 horas os animais que receberam a dieta com 3% de polpa de manga apresentaram concentração sérica de AST menor que o controle e de GGT menor que os animais que receberam a dieta com 10% de polpa de manga. Além disso, no experimento de 25 dias os animais que receberam a dieta com 10% de manga apresentaram maior nível sérico de ALT que os animais que receberam a dieta suplementada com vitamina E. A análise do marcador de peroxidação lipídica no experimento de 25 dias demonstrou que

os animais que receberam a dieta com 10% de polpa de manga Ubá apresentaram concentração de malondialdeído maior que os que receberam a dieta controle e manga 3%. Os animais que receberam a dieta suplementada com 3% de polpa de manga no experimento de 24 horas apresentaram diminuição da atividade da superóxido dismutase em relação ao controle, resultado que não foi encontrado na ingestão crônica desta dieta. A expressão do gene HSP 70 não variou com as dietas suplementadas com manga e com vitamina E, porém os animais que receberam a dieta com 10% de manga no experimento de 25 dias apresentaram redução significativa na expressão dos genes HSP70 em comparação com os animais que receberam esta dieta no experimento de 24 horas. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho indicam que os antioxidante presentes na dieta suplementada com 3 e 10% de polpa de manga Ubá ingeridos de forma aguda e crônica podem interferir sobre os mecanismos de defesa antioxidante e marcadores de injúrias hepáticos, uma vez que a menor suplementação ingerida por 24 horas diminuiu a concentração da AST e atividade da SOD hepática, enquanto que a ingestão por 25 dias de 10% de polpa de manga aumentou a peroxidação lipídica no fígado de ratos wistar saudáveis.

ABSTRACT

TOLEDO, Renata Celi Lopes, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, July 2010. **Evaluation of acute and chronic ingestion of mango pulp Uba (*Mangifera indica* L.) in the serum homeostasis, in the expression of HSP 70 and in the superoxide dismutase activity in rats.** Advisor: José Humberto de Queiroz. Co-Advisors: Sônia Machado Rocha Ribeiro, Maria do Carmo Gouveia Peluzio, Márcia Rogéria de Almeida e Cláudio Lisias Mafra de Siqueira.

The mango (*Mangifera indica* L.) is among the tropical fruits of greater economic impact in the Brazilian and international markets. The Ubá variety is very productive and well known in some regions of Brazil, especially in the Zona da Mata de Minas Gerais. This fruit is known for its nutritional value, being a rich source of ascorbic acid, carotenoids and phenolic compounds, molecules that have great potential in biological antioxidant. Epidemiological studies have shown evidence that antioxidants present in fruits and vegetables are the main factors contributing to the low incidence of diseases related to oxidative stress. This study aimed to evaluate the effect of acute and chronic ingestion of diets supplemented with 3% and 10% mango pulp Ubá in the modulation of biomarkers of endogenous antioxidant system (superoxide dismutase and HSP 70) and biochemical markers of oxidative stress (aminotransferase enzymes and malondialdehyde) in healthy Wistar rats. The results showed that intake of diets supplemented with 3% and 10% mango pulp showed affect on markers of injuries once that in the experiment of 24 hours the animals fed diets with 3% mango pulp diets showed level of serum AST lower that control and level serum GGT lesser than the animals fed diets with 10% mango pulp. Furthermore, in the experiment of 25 days, the animals fed diets with 10% of mango had higher serum ALT that animals fed diets supplemented with vitamin E. Analysis of lipid peroxidation marker in the 25 day experiment showed that animals fed diets with 10% mango pulp Ubá showed higher malondialdehyde concentrations than those fed control diet and 3% mango. Animals receiving the diet supplemented with 3% mango pulp in the experiment of 24 hours showed

decreased activity of superoxide dismutase as compared to control, a result that was not found in chronic ingestion of this diet. The HSP 70 gene expression did not change with the diets supplemented with vitamin E and mango pulp, but the animals fed diets with 10% of mango in the experiment of 25 days showed a significant reduction in the expression of HSP70 genes compared with animals received this diet in the experiment of 24 hours. Therefore, the present results indicate that the antioxidant present in the diet supplemented with 3 and 10% mango pulp Ubá ingested acutely and chronically may interfere with antioxidant defense mechanisms and markers of liver injury, since supplementation with 3 % mango pulp Ubá ingested per 24 hours decreased the concentration of AST and hepatic SOD activity, whereas the intake per 25 days of 10% mango pulp increased lipid peroxidation in the liver of healthy Wistar rats..

INTRODUÇÃO

A manga (*Mangifera indica L.*) pertence à família *Anacardiaceae* e figura entre as frutas tropicais de maior expressão econômica nos mercados brasileiro e internacional. É uma fruta de tamanho e formato variável, com grande quantidade de polpa, a qual se caracteriza pelo aroma e cor muito agradáveis. Além disso, a manga se destaca pelo seu valor nutricional, apresentando um alto teor de sólidos totais, sendo uma rica fonte de carotenóides e carboidratos. Esta composição química pode diferir entre as variedades, pelas condições de cultura, estágio de maturação, entre outros fatores (MARTIM, 2006).

Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado evidências de que antioxidantes fenólicos de cereais, frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a baixa incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações, cujas dietas são ricas na ingestão desses alimentos.

Os processos metabólicos em especial a cadeia respiratória, produz espécies reativas de oxigênio (EROS), as quais quando não controladas, podem provocar danos extensivos ao organismo, sendo importante que haja um balanço entre a produção de radicais livres e as funções antioxidantes evitando assim o estresse oxidativo (ROESLER *et al.*, 2007; FERRO *et al.*, 2010).

Para combater o potencial destrutivo das EROS, o organismo dispõe de sistema de proteção antioxidante formado por enzimas e compostos de baixo peso molecular, os quais encontram-se situados nas membranas de organelas, ou no meio intracelular protegendo direta ou indiretamente as células de danos oxidativos (FERRO *et al.*, 2010). Os antioxidantes agem com os radicais livres antes que estes possam reagir com as moléculas biológicas, evitando que ocorram as reações em cadeia ou prevenindo a ativação do oxigênio a produtos altamente reativos (PEREIRA *et al.*, 2009). Quando a disponibilidade de antioxidantes encontra-se limitada, o dano por espécies reativas pode resultar no estresse oxidativo, causando lesão tecidual direta, peroxidação lipídica das membranas celulares, carbonilação das proteínas e alteração do DNA (RIBEIRO *et al.*, 2005).

A primeira linha de defesa contra os radicais livres no organismo ocorre pela ação das superóxido dismutases, que por dismutação do ânion superóxido produz o peróxido de hidrogênio, o qual é convertido em água pela ação da catalase e/ou glutathione peroxidase. Além dessas enzimas, o organismo dispõe de outros sistemas antioxidantes, como a indução de síntese de proteínas de estresse, HSP 70 (*Heat Shock Proteins*), as quais têm sua expressão aumentada em uma variedade de condições, tais como: hipertermia, privação de glicose, concentração intracelular aumentada de íons cálcio, estresse oxidativo, hipóxia, bem como outros tipos de estresse metabólico (VELLOSA *et al.*, 2007).

O potencial mecanismo de proteção da HSP parece ser importante contra os danos causados pelo estresse oxidativo. A HSP 70 tem o papel de proteger a célula dos danos causados pelo estresse, ligando-se parcialmente as proteínas desnaturadas, associando os agregados da proteína e regulando a dobradura correta e translocação intracelular de proteínas re-sintetizadas (RODRIGUEZ *et al.*, 2006). Em cultura de células da glia de camundongos, a habilidade de HSP 70 em proteger contra a exposição ao peróxido de hidrogênio foi associada ao aumento dos níveis de glutathione, sugerindo que HSP 70 poderia proteger as células através de um mecanismo antioxidante (NETO *et al.*, 2008).

Segundo Ratnam *et al.* (2006), o sistema de defesa antioxidante humano não é completo sem os antioxidantes dietéticos, o que confirma a importância da ingestão diária destes compostos. Dessa forma, o consumo de antioxidantes apresenta vários benefícios, proporcionando uma melhoria na qualidade de vida da população (PEREIRA *et al.*, 2009).

Em estudo anterior comprovou-se que a polpa de manga da variedade Ubá apresenta um alto teor de antioxidantes, sendo este constituído por um total de 12 flavonóides e xantonas (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Muitos estudos, na maioria *in vitro*, analisaram a ação de compostos antioxidantes, verificando que estes podem desempenhar tanto ação antioxidante quanto pró-oxidante, dependendo da quantidade. No entanto, grande parte desses estudos verifica a ação de um antioxidante isolado, o que não permite analisar como estes agem no organismo, onde ocorrem interações

entre moléculas que podem tanto aumentar quanto diminuir a ação destes compostos.

Devido à importância dos antioxidantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas, percebe-se a necessidade de avaliar a relação dos antioxidantes naturais da dieta com os outros sistemas de defesas antioxidantes do organismo, como a expressão da chaperona HSP 70 e da superóxido dismutase aprofundando dessa maneira o conhecimento sobre a interação dos sistemas antioxidantes endógeno e exógeno.

Neste estudo foi verificado que os antioxidante presentes na dieta suplementada com 3 e 10% de polpa de manga Ubá ingeridos de forma aguda e crônica podem interferir sobre os mecanismos de defesa antioxidante e marcadores de injúrias hepáticos, sendo a dieta com 10% de polpa de manga pro-oxidativa ao fígado de ratos wistar saudáveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Manga

A manga é uma fruta nativa do sudeste asiático, mais precisamente da Índia, onde é cultivada há mais de quatro mil anos. O Brasil foi o primeiro país da América a cultivar a mangueira que foi trazida pelos portugueses no século XVI e plantada no Rio de Janeiro, de onde se difundiu para todo o País, chegando em 1.700 em Itamaracá na Bahia, às Antilhas em 1.742 e depois ao México (FILHO, 1980, FILHO *et al.*, 2004).

Segundo o IBGE em 2006, o Brasil, destaca-se como sexto maior produtor mundial, com produção de 1.217.187 toneladas em 78.485 ha com um rendimento total de 616.568 milhões de reais. Os principais estados produtores do País são: Bahia (625.812 toneladas em área plantada de 30.703 ha), Pernambuco (170.333 toneladas com área plantada de 9.233 ha) e São Paulo (156.954 em área plantada de 13.401 ha) (AMORIM *et al.*, 2008).

A comercialização da manga no mercado interno brasileiro centraliza-se basicamente em uma única variedade, a norte-americana Tommy Atkins, que representa 79% da área plantada no País (GALLI *et al.*, 2008). Contudo a manga Ubá (*Mangifera indica* L. variedade Ubá) é bastante conhecida em algumas regiões do Brasil, sobretudo no Estado de Minas Gerais, destacando-se industrialmente na fabricação de sucos por possuir excelentes qualidades de sabor e aroma, além de manter sua coloração amarelo-claro e aroma original mesmo após o processamento industrial (FARAONI *et al.*, 2009).

A variedade Ubá é muito produtiva, podendo render, anualmente, mais de mil frutos por planta (DONADIO, 1996). Caracteriza-se por apresentar, polpa macia, firme, doce e fibras curtas, sendo o fruto pequeno com média de $5,7 \pm 0,31$ cm de comprimento transversal e $7,5 \pm 0,45$ cm de comprimento longitudinal, possuindo o peso médio de $143,8 \pm 22,5$ g (FARAONI *et al.*, 2009).

Segundo Berniz (1984), dentre as seis variedades de manga (Ubá, Haden, Extrema, Taú, Jasmim e Espada) estudadas para a elaboração de néctar, a Ubá apresentou o segundo maior rendimento de polpa (63%), perdendo apenas para a variedade “Extrema”.

A manga é considerada uma rica fonte de antioxidantes, incluindo ácido ascórbico, carotenóides e compostos fenólicos, sendo o β -caroteno o mais abundante entre eles (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Ribeiro *et al.* (2007) avaliou os teores antioxidantes em polpa de manga encontrando valores de 77,71 mg de ácido ascórbico total, 2.220 μ g de β -caroteno e 208,70 mg de compostos fenólicos em 100 g de polpa de manga Ubá, sendo esses valores maiores que os encontrados em outras variedades.

Segundo Faraoni *et al.* (2009), a manga Ubá pode apresentar variação quanto ao seu teor de vitamina C, sendo encontrado valores entre 75,55 mg a 182,55 mg em 100 g de polpa in natura. Esta divergência entre os teores de vitamina C pode estar associada às diferenças nos estádios de maturação dos frutos, nas condições de cultivo, no clima e no tipo de solo da região. Cardello e Cardello (1998), analisando a correlação entre a atividade da ascorbato oxidase e o teor de vitamina C da manga Haden, verificaram que, durante o processo de amadurecimento da fruta, o teor de ácido ascórbico diminuíra consideravelmente, enquanto a atividade da ascorbato oxidase havia aumentado significativamente durante o mesmo período.

Um total de 12 flavonóides e xantonas foi identificado na polpa, casca e semente das variedades Haden, Tommy Atkins, Palmer e Ubá, sendo esta última a que apresentou maior quantidade desses compostos. A mangiferina foi detectada na polpa da variedade Haden 2,9 mg, Tommy 2,2 mg e na Ubá 12,4 mg/kg de matéria seca. A isomangiferina foi detectada somente nas polpas das variedades Tommy e Ubá. O conteúdo de quercetin 3-O-glicosídeos e de xantona-C-glicosídeos foi, respectivamente, de 13,4 mg e 19,3 mg/kg de matéria seca na variedade Ubá. Todos estes flavonóides e xantonas foram encontrados em maior quantidade na casca e semente da fruta, sendo, respectivamente, 4,6 e 7,3 vezes maior que na polpa (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Em outro estudo avaliando o teor de compostos antioxidantes em diferentes frutas foi observado que os extratos de polpa de acerola e de manga continham um alto teor de polifenóis totais (580,1 mg/100 g e 544,9 mg/100 g, respectivamente), enquanto as polpas de açaí (136,8 mg/100 g), morango (132,1 mg/100 g) e uva (117,1 mg/100 g) apresentaram menores valores destes compostos, embora também significantes (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

A capacidade antioxidante não é determinada somente pela soma dos diversos compostos bioativos presente no alimento, mas também depende da combinação destes com o microambiente, a qual pode ser sinérgica ou antagônica. Por outro lado, é necessário considerar que os testes *in vivo* podem apresentar situações em que não se consegue avaliar o efeito destes compostos, como nos casos de adaptabilidade do organismo em resposta ao aumento do estresse oxidativo (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

2.2. Processos oxidativos

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), de nitrogênio (ERNS), entre outras, é parte integrante do metabolismo e é observada em diversas condições fisiológicas, porém a sua produção deve ser equilibrada pelo sistema de defesa antioxidante do organismo evitando assim o estresse oxidativo.

O termo radical livre é empregado quando um átomo ou uma molécula apresentam um ou mais elétrons não pareados, constituindo-se espécies instáveis, com meia-vida muito curta e que se estabilizam no meio biológico adquirindo elétrons de estruturas celulares, como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios, carboidratos e várias outras moléculas (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Esses compostos encontram-se envolvidos em várias situações no organismo: produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, as EROS e ERNS devem ser mantidas em concentrações fisiológicas, uma vez que quantidades excessivas causam efeitos prejudiciais ao organismo, como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas, enzimas, carboidratos e DNA, levando a uma cascata de reações que podem desencadear o estresse oxidativo, resultando em dano celular e doenças (BARREIROS *et al.*, 2006).

Os principais tipos de EROS conhecidos são o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^\cdot).

Do total de oxigênio disponível pela célula, 95 a 98% são utilizados como aceptor final de elétron na cadeia respiratória, sendo totalmente reduzidos com a formação de água. Entretanto cerca de 2 a 5% do oxigênio

são gerados como um intermediário reduzido por um elétron formando o ânion superóxido (TURRENS; BOVERIS, 1980).

A formação de EROS se dá primeiramente pelo radical superóxido, o qual não é considerado altamente reativo por agir somente nos compartimentos onde tenha sido produzido e por apresentar deficiente habilidade para penetrar membranas lipídicas. Além da produção espontânea do radical superóxido na cadeia respiratória, estes podem ser formados de outras maneiras por meio da ação de flavoenzimas como a xantina-oxidase (casos de reperfusão isquêmica), lipooxigenases, ciclooxigenases, atividade da NADPH-oxidase e células fagocíticas (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Normalmente o ânion superóxido é removido pela superóxido dismutase, por meio da reação de dismutação de dois ânions superóxido formando o H_2O_2 , o qual não é considerado um radical livre. No entanto, se o peróxido de hidrogênio não sofrer ação da catalase este pode ser adicionado de um ânion superóxido ou de um metal de transição (Fe) formando o radical hidroxil. Este composto, apesar de seu baixo tempo de vida, é considerado o mais potente oxidante em sistemas biológicos por apresentar capacidade de atravessar membranas e reagir com biomoléculas como lipídeos insaturados e DNA (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999).

Um dos danos causados pelas EROS no organismo é a peroxidação de lipídios, a qual se caracteriza por uma reação em cadeia de formação de radical livre iniciada pelo radical hidroxil que age sobre os ácidos graxos da membrana fosfolipídica, formando os hidroperóxidos de lipídeos. Esta reação gera um grande número de produtos de degradação como malondialdeído (MDA), que acarretam alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997, AJILA *et al.*, 2007).

O MDA em níveis elevados possui ação citotóxica e genotóxica em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo (ANDRADE *et al.*, 2005).

O teor de MDA nos sistemas biológicos é um parâmetro importante para avaliação do índice de peroxidação lipídica, servindo como um marcador de estresse oxidativo celular. A reação do MDA com ácido tiobarbitúrico (TBA) tem sido amplamente adotada como um método sensível para a dosagem da peroxidação lipídica, sendo o produto detectado através de leitura espectrofotométrica na região do visível. Embora este método ainda seja

amplamente utilizado, ele não é específico para detecção dos produtos de peroxidação lipídica, uma vez que quantifica a soma das diferentes substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, denominadas TBARS. Desta forma, os valores de TBARS incluem interferentes provenientes da reação do TBA com outras substâncias presentes na amostra, como por exemplo, carboidratos e proteínas (ANTUNES *et al.*, 2008).

2.3. Sistemas Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que, quando em pequenas quantidades, são capazes de retardar ou inibir processos oxidativos, como, por exemplo, a lipoperoxidação (ATOUI *et al.*, 2005; CHUN *et al.*, 2005). A formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) é equilibrada naturalmente pela existência desses compostos (VELLOSA *et al.*, 2007).

A primeira linha de defesa antioxidante endógena contra as EROS é constituída pelo sistema enzimático. No entanto, para impedir os danos celulares decorrentes de estresse oxidativo persistente, o aporte exógeno de substâncias com potencial antioxidante é de fundamental interesse.

Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas: i) uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, constituída pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E; ii) a outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px. Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (ROSS; MOLDEUS, 1991; VELLOSA *et al.*, 2007).

Os antioxidantes exógenos, como o tocoferol, ascorbato, carotenóides e compostos fenólicos presentes nos alimentos constituem o principal mecanismo antioxidante não enzimático do organismo, incluindo moléculas lipofílicas ou hidrofílicas, que protegem compartimentos apolares e polares do meio biológico, respectivamente (STIPANUK, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2005).

2.3.1. Defesas antioxidantes não-enzimáticas

A vitamina E é a principal vitamina lipossolúvel presente no plasma e na partícula de LDL, podendo se apresentar em quatro isoformas: alfa, beta, gama e delta-tocoferol. O alfa-tocoferol é a forma biológica mais ativa e a mais estudada até o momento (HONARBAKHS; SCHACHTER, 2009). Os tocoferóis convertem radicais livres em espécies mais estáveis ou menos reativas por meio da doação de um átomo de hidrogênio. É importante notar que, ao proteger os lipídeos da oxidação, a vitamina E se converte em um radical tocoferil, precisando ser regenerada para recuperar seu potencial antioxidante. Do sistema de regeneração da vitamina E, participam o ácido ascórbico, a enzima glutatona-reduzida e a coenzima Q10 (NWOSE *et al*, 2008). Apesar de estudos terem comprovado a ação antioxidante desta vitamina, outros, no entanto, verificaram que em altas doses a vitamina E pode ser responsável pela propagação da peroxidação lipídica, podendo inclusive diminuir a atividade das enzimas SOD e CAT (GATE *et al*, 1999).

A vitamina C, ou ácido ascórbico é considerado um antioxidante “primário” ou “preventivo”, uma vez que tem a capacidade de reagir com as espécies reativas de oxigênio impedindo o processo oxidativo, além de participar do sistema de regeneração da vitamina E, sendo, portanto, de fundamental importância para manter o potencial antioxidante do plasma (AMES, 2001). Apesar da grande eficiência antioxidante, a vitamina C também age paradoxalmente como pró-oxidante *in vitro*. A reação de Fenton, redução de peróxido de hidrogênio por Cu^{1+} ou Fe^{2+} a radical hidroxila, é favorecida na presença de vitamina C, capaz de reduzir os metais de transição, tornando-os aptos para esta reação. *In vivo* os metais encontram-se complexados com proteínas, portanto, indisponíveis. Já em situações patológicas em que a quantidade de ferro e/ou cobre livre está elevada, por ex. talassemias, hemocromatose e injúria tecidual, a atividade pró-oxidante pode ser relevante (HERBERT *et al.*, 1996).

Apesar dos dados contraditórios, a importância da vitamina C como antioxidante é bem estabelecida, considerando-se as doses recomendadas geralmente alcançadas por meio da alimentação. Além da captação de radicais livres, estudos em cultura de células demonstram que a vitamina C pode alterar

a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória, apoptose e diferenciação celular. O mecanismo pelo qual a vitamina C altera a expressão de genes é desconhecido, mas supõe-se que ela atue indiretamente alterando a expressão de genes responsivos a espécies oxidantes ou diretamente, modulando a ligação de alguns fatores de transcrição ao núcleo (CERQUEIRA *et al.*, 2007).

Enquanto as evidências ainda são insuficientes, a suplementação com vitamina E ou C não deve ser recomendada indiscriminadamente, uma vez que seu benefício não é comprovado e, em alguns casos, apresenta efeito pró-oxidante. Mais estudos com dietas ricas nestas vitaminas são necessários para elucidar como a atuação combinada destes e outros antioxidantes são capazes de prevenir doenças.

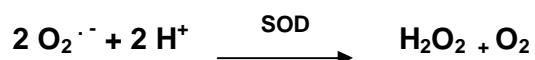
Os carotenóides dietéticos, presentes especialmente em frutas e hortaliças, exercem papel protetor importante contra doenças cardiovasculares e certos tipos de cânceres (BUIJSSE *et al.*, 2005). Ainda que o mecanismo de proteção não esteja totalmente elucidado, depende em parte da sua atividade antioxidante (MCNULTY *et al.*, 2008). Outras ações, como sua participação na regulação do crescimento celular e na modulação da expressão gênica, também podem estar relacionadas ao seu efeito protetor (RAO & RAO, 2007).

A estrutura molecular comum aos carotenóides é parcialmente responsável por sua ação antioxidante, em razão de sua capacidade de reagir com o oxigênio *singlet*, interrompendo a propagação de reações de peroxidação lipídica (MCNULTY *et al.*, 2008). Entretanto, diferenças nas ações dos diversos carotenóides revelam que há dúvidas sobre a forma como essas substâncias atuam como antioxidantes. É relevante mencionar que alguns carotenóides, como o β -caroteno, podem apresentar propriedades pró-oxidantes em condições específicas (CATANIA *et al.*, 2009), o que reforça a necessidade de mais estudos para esclarecer os mecanismos pelos quais os carotenóides exercem seus efeitos na saúde humana.

2.3.2. Defesas antioxidantes enzimáticas

2.3.2.1. Superóxido dismutases

As superóxido dismutases (SOD) correspondem a uma família de enzimas com diferentes grupos protéticos em sua composição, elas atuam sobre o radical superóxido convertendo-o em peróxido de hidrogênio. Existem duas formas de SOD no sistema eucariótico: forma citosólica, Cu/Zn-SOD, presente principalmente no citosol, que contém o íon cobre (Cu) no seu sítio ativo, o qual participa da reação, e o íon zinco (Zn), que tem função de estabilização molecular; e outra localizada primariamente na mitocôndria, a Mn-SOD, que possui o íon manganês em seu sítio ativo, que participa na reação de dismutação (NETO, *et al.*, 2008). A Mn-SOD é classificada como proteína induzível enquanto que a Cu/Zn-SOD é considerada constitutiva (WHITE, 1993). Além disso, deve ser salientado que o mecanismo de expressão gênica da Mn-SOD foi mais bem estudado que o da Cu/Zn-SOD sendo que essa última parece ser expressa em altos níveis em mamíferos e é menos induzível que a Mn-SOD (WAGNER, 1994; WHITE, 1993).

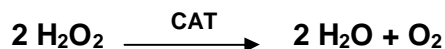


O produto final dessa reação, H_2O_2 , é um metabólito extremamente deletério ao organismo, pois apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, ele participa da reação que produz o radical hidroxil (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Além disso, o H_2O_2 é altamente tóxico para as células, pois tem vida média longa e é capaz de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com membranas biológicas ou com proteínas ligadas ao íon Fe^{++} (VELLOSA, *et al.*, 2007).

2.3.2.2. Catalase

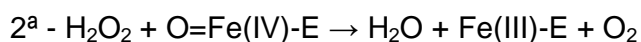
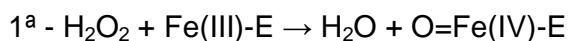
A catalase (hidroperoxidase) é uma enzima intracelular, encontrada nos peroxissomas de animais e plantas e também no citoplasma de procarionte.

Esta enzima é responsável pela dismutação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) conforme a reação abaixo:



Esta reação também pode ocorrer na ausência da catalase, pela chamada reação de Fenton, porém de forma mais lenta, devido à presença de quantidades vestigiais de metais em solução (HALLIWELL; GUTTERIDG, 1990).

O mecanismo da reação da catalase na decomposição do peróxido de hidrogênio ocorre em duas etapas fundamentais:



Fe-E: representa o átomo de ferro do grupo heme ligado à enzima.

Sendo tóxico para as células, o peróxido tem de ser rapidamente convertido numa espécie química inócua. A catalase tem o mais alto número de *turnover* (k_{cat}) conhecido em enzimas: uma molécula de catalase pode catalisar a decomposição de até 40.000.000 moléculas de peróxido de hidrogênio por segundo, o que a tornar uma enzima importante para a desintoxicação das células (NELSON; COX, 2005).

2.3.2.3. Glutathiona peroxidase

A glutathiona peroxidase (GSH-Px) se localiza no citosol e na matriz mitocondrial, sendo juntamente com a catalase responsável pela redução do peróxido de hidrogênio, porém esta é menos específica para este substrato que a primeira podendo catalisar também os hidroperóxidos orgânicos.



A redução do H₂O₂ ocorre através da oxidação da glutatona reduzida (GSH). Para restabelecer a glutatona oxidada (GSSH) à reduzida, é necessário que a glutatona redutase (GSH-Rd) promova a regeneração da GSSH, consumindo NADPH (HALLIWELL; GUTTERIDG, 1999).

2.3.3. Mecanismo de reparo (*Heat Shock Proteins* – HSP 70)

As células de todos os organismos respondem a uma variedade de condições estressantes por meio de uma rápida transcrição e subsequente tradução de uma série de proteínas altamente conservadas, denominadas “proteínas de estresse”. O termo “proteína de estresse” tem caráter genérico na descrição de eventos biológicos, uma vez que diferentes estímulos podem induzir o mesmo mecanismo de defesa celular (LOCKE et al., 1990, MAYER; BUKAU, 2005).

O estresse térmico ou químico induz aumentos na produção de uma classe de proteínas denominadas de proteínas de choque térmico ou *Heat Shock Proteins* (HSP). Estruturalmente as HSPs são altamente conservadas, desde os seres primitivos (procariontes) até o homem. Tais proteínas podem ser agrupadas em famílias, de acordo com suas seqüências de aminoácidos e com suas massas moleculares, ou seja, de acordo com suas funções e tamanhos (MAYER; BUKAU, 2005).

Diversos tipos de estresses metabólicos afetam de modo descontrolado, a conformação correta e, conseqüentemente, a função das proteínas. Nas condições em que as proteínas incorretamente dobradas se acumulam nas células, começa uma resposta ao estresse, ou *Heat Shock Response* (HSR). Esta se inicia pela ativação de um fator específico de transcrição, chamado HSF-1 (*Heat Shock Factor*, ou fator do choque térmico). Esse fator estaria presente na célula normal na forma de monômero inativo e em resposta ao estresse metabólico, rapidamente sofreria trimerização, o que tornaria possível sua ligação imediata a uma seqüência de nucleotídeos, chamada de elemento do choque térmico (*Heat Shock Element* - HSE), localizada dentro da região promotora dos genes que codificam as HSP, tudo resultando em alto nível de transcrição dos genes que codificam estas proteínas (ABRAVAYA et al., 1992; MORIMOTO, 1993, VAN WHY et al., 1994).

As HSPs são consideradas “chaperonas”, uma vez que, sem fazer parte da estrutura final das proteínas, desempenham funções importantes evitando interações incorretas entre estas, auxiliando na sua montagem e síntese, facilitando o dobramento correto de proteínas recém sintetizadas e as suas translocações para os compartimentos celulares. Esses mecanismos são considerados de grande importância por conferirem proteção ao organismo, (MAYER; BUKAU, 2005).

As quatro isoformas da família HSP 70: HSP 72 e 73; Grp (*Glucose regulated proteins*) 75 e 78 são as HSPs mais abundantes e amplamente estudadas em eucariotos. Suas massas moleculares são similares, mas os padrões de indução e expressão são distintos. Ressalta-se que estas proteínas não são variantes do mesmo gene, mas sim oriundas de genes diferentes. Todas elas partilham da mesma propriedade de ligação com o ATP, mas têm uma distribuição celular diferente (BROWN *et al.*, 1993). As HSP72 e HSP73 com função de manter e reparar a conformação protéica estão localizadas no citoplasma e no núcleo. A HSP 72 é a única expressa exclusivamente por eventos de estresse, enquanto as demais isoformas podem também ser expressas constitutivamente (*Heat Shock Cognates* - HSC), sendo altamente induzida pelo exercício físico em músculos esquelético e cardíaco (SNOECKX *et al.*, 2001).

A HSP 73 é conhecida como HSP 70 constitutiva ou HSP 70 cognata. Essa isoforma também é induzida por estresse, porém muito levemente e exerce funções de chaperonas para outras proteínas. A Grp 75 se localiza nas mitocôndrias, onde age como chaperona para as proteínas das mitocôndrias, enquanto a Grp 78, também conhecida como BIP, reside no lúmen do retículo endoplasmático, onde se liga a proteínas facilitando sua passagem pelo retículo endoplasmático e oferecendo proteção à célula (BROWN *et al.*, 1993. SNOECKX *et al.*, 2001).

Observações feitas em ratos após isquemia cerebral sugerem que a expressão prolongada de HSP70 potencializa o efeito protetor da SOD por meio da sua função de chaperonina. A Hsp70 parece ter ainda efeito inibidor sobre a enzima óxido nítrico sintetase, atenuando o estresse oxidativo produzido durante a inflamação e isquemia (TOGNI, 2007).

A expressão da HSP 70 é alterada rapidamente em situações de estresse. Segundo Paidas *et al* (2002), em experimento com camundongos, esta proteína foi detectada com 4 h de estresse térmico, alcançado o nível máximo após 24 h de injúria, sendo então, reduzido após três dias e não detectado ao final de cinco dias de injúria.

Theodorakis *et al* (1988), ao aplicar choque térmico em reticulócitos de galinha, obteve níveis de RNA mensageiro de HSP 70 aumentados duas vezes, enquanto a síntese protéica foi elevada em 10 vezes. Nos indivíduos estressados, os níveis de RNA mensageiro diminuíram, em valores absolutos, com a idade, concordando com resultados obtidos em experimento com aves por Wang; Edens (1993) e com ratos por Heydari *et al* (1993) os quais verificaram diminuição com a idade, nos níveis da HSP 70 e no seu RNA mensageiro (DIONELLO *et al.*, 2001).

A avaliação da proteína HSP 70 pode ser feita por diferentes métodos, podendo ser este qualitativo, como eletroforese e “western blotting”, ou quantitativo como RT-PCR em tempo real (transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase em tempo real), por meio da quantificação relativa da expressão do gene da proteína.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da ingestão aguda e crônica da polpa de manga Ubá na homeostase sérica, na expressão da HSP 70 e na atividade da superóxido dismutase em ratos Wistar.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito agudo (24 horas) e crônico (25 dias) da dieta suplementada com 3 e 10% de polpa de manga sobre:
 - I. Consumo alimentar;
 - II. Ganho de peso;
 - III. Índice hepatossomático;
 - IV. Parâmetros bioquímicos séricos: aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gama glutamil transferase, colesterol total, HDL-c, triacilgliceróis, glicemia de jejum;
 - V. Peroxidação lipídica no tecido hepático pela quantificação da concentração de malondialdeído;
 - VI. Atividade da superóxido dismutase hepática;
 - VII. Expressão da proteína HSP 70 no tecido hepático.

- Avaliar o efeito da suplementação de vitamina E (α -tocoferol) nos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e defesa do organismo em período de exposição de 24 horas e 25 dias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Metabolismo e Fermentação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

4.1. Preparo da amostra

As mangas foram obtidas no comércio local, higienizadas, pesadas individualmente e, em seguida, abertas para a retirada da polpa. Esta foi homogeneizada e armazenada em ultra-freezer (Thermo Scientific) a - 80° C por 48 horas, sendo depois liofilizada e acondicionada, em frasco revestido por papel alumínio, a - 20°C.

4.2. Preparo das dietas

As dietas foram preparadas de acordo com Reeves *et al.*, (1993), sendo formuladas quatro diferentes dietas: controle (AIN-93G); experimentais AIN-93G acrescida de 3% ou 10% de polpa de manga liofilizada e dieta controle positivo AIN-93G acrescida de 150 mg de α -Tocoferol / Kg de dieta (tabela 1).

Todas as dietas apresentaram a mesma proporção de carboidratos (64,0%), proteínas (20,0%) e lipídios (16,0%), com densidade calórica de 3,76 cal/g (REEVES *et al.*, 1993). As dietas foram confeccionadas utilizando ingredientes da marca Rhooster®, sendo que as suplementadas com polpa de manga tiveram a quantidade de amido dextrinizado e fibra corrigida de acordo com o teor destes constituintes presentes na polpa de manga, segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006) (tabela 1).

As dietas foram preparadas semanalmente e mantidas sob refrigeração a 4°C para evitar a oxidação.

Tabela 1 - Composição centesimal das dietas experimentais.

Ingrediente	Dieta AIN-93	Dieta Experimental	Dieta Controle positivo
Caseína (81,50%)	200,00 g	200,00 g	200,00 g
Amido Dextrinizado	132,00 g	104,1g (3% manga) 39,1g (10% manga)	132,00 g
Sacarose	100,00 g	100,00 g	100,00 g
Óleo de soja	70,00 mL	70,00 mL	70,00 mL
Celulose microcristalina	50,00 g	47,9 g (3% manga) 42,9g (10% manga)	50,00 g
Mistura mineral	35,00 g	35,00 g	35,00 g
Mistura de vitaminas	10,00 g	10,00 g	10,00 g
L-Cistina	3,00 g	3,00 g	3,00 g
Colina	2,50 g	2,50 g	2,50 g
Polpa de manga liofilizada	–	30,00 g (3%); 100,00 g (10%).	–
α -Tocoferol	–	–	150 mg
Amido de milho	q.s.p. 1.000 g	q.s.p. 1.000 g	q.s.p. 1.000 g

Fonte: Adaptado de Reeves *et al*, 1993

4.3. Delineamento experimental

O estudo foi realizado após ser aprovado previamente pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (protocolo: 01/2010) seguindo a legislação vigente sobre os Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados 48 ratos machos, albinos da linhagem Wistar, recém-desmamados e média de peso de 60g. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Viçosa, sendo aos 25 dias de idade transferidos para o Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde (UFV). Os animais permaneceram durante todo o período experimental, sob controle de

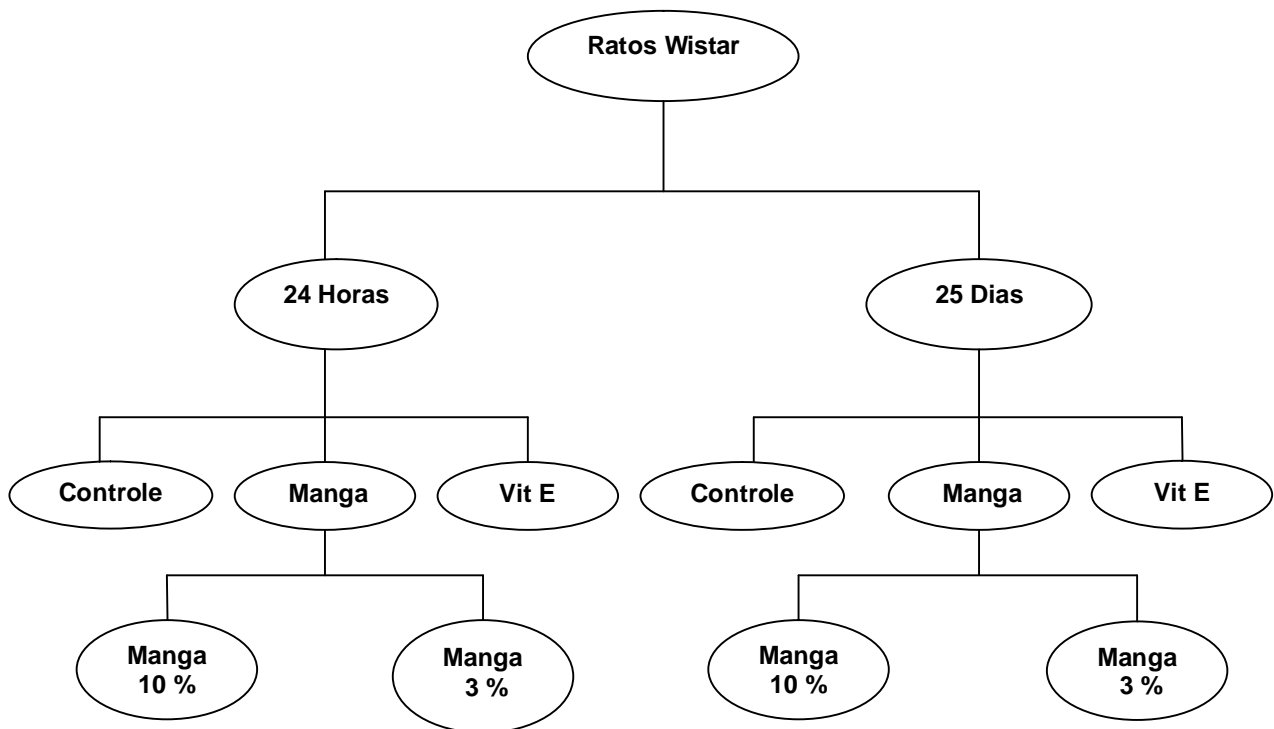
temperatura de 22 - 25°C e fotoperíodo de 12 horas, recebendo dieta e água *ad libitum*. Os ratos foram distribuídos individualmente em gaiolas de arame galvanizado.

Os animais foram divididos em dois experimentos constituídos pelos mesmos grupos experimentais, porém duração diferente, sendo um por 24 horas e o outro por 25 dias. Estes dois experimentos foram formados por quatro grupos de seis animais cada (tabela 2 e figura 1):

Tabela 2 – Grupos e dietas experimentais.

Grupos	Dietas Experimentais
Controle	Dieta AIN-93G
Manga 3%	Dieta AIN-93G + 3% manga liofilizada
Manga 10%	Dieta AIN-93 + 10% manga liofilizada
Vitamina E	Dieta AIN-93 + 150 mg de alfa-tocoferol/Kg dieta

Figura 1. Desenho experimental



Na primeira semana os animais ficaram em período de adaptação recebendo a dieta controle AIN-93, em seguida esta foi substituída pelas respectivas dietas experimentais.

Foram obtidas duas medidas de peso dos animais de 24 horas (anterior e posterior à dieta experimental), enquanto que a determinação de peso dos animais do grupo de 25 dias foi feita semanalmente.

A ingestão alimentar foi determinada diariamente, sendo esta cuidadosamente monitorada durante todo o período experimental através da mensuração da diferença entre a ração ofertada ao animal e a sobra da mesma no comedouro.

Após os períodos experimentais os animais ficaram em jejum por 12 horas, sendo então submetidos individualmente à eutanásia. O sangue dos animais foi coletado em tubos heparinizados para que não ocorresse hemólise, e o fígado imerso em nitrogênio líquido, sendo em seguida congelado a -80°C para análises posteriores.

4.4. Parâmetros bioquímicos séricos

O sangue foi coletado em tubos heparinizados e em tubos com EDTA e citrato de sódio, sendo este último ideal para análise de glicose. O soro foi separado por centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos, sendo em seguida utilizado para avaliar a integridade hepática por meio das enzimas: Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), Gama glutamil transpeptidase (GGT). Além disso, foram realizadas outras análises bioquímicas: glicemia de jejum, triacilgliceróis, colesterol total, colesterol HDL. Utilizou-se para a análise dos parâmetros bioquímicos kits comerciais da marca Bioclin® e o equipamento Alizé® (analisador automático de Bioquímica).

4.5. Parâmetros avaliados em homogeneizado de fígado

O fígado (500 mg) foi pesado e homogeneizado em 5 mL de tampão Tris 0,01M, pH 7,4 durante 30 segundos em homogeneizador com banho de gelo (Quimes). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados entre 0 e 4°C por 10 minutos a 3000 rpm, em centrífuga refrigerada da Thermo Cientific.

Retirou-se o sobrenadante armazenando-o em ultra-freezer (Thermo Cientific) a - 80°C para as análises posteriores.

4.5.1. Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Bradford utilizando como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 0,2 mg/mL (BRADFORD, 1976).

Inicialmente preparou-se 400 mL de reagente de Bradford concentrado 5X (200 mg de coomassie blue G-250, 100 mL de etanol absoluto 95%, 200 mL de ácido fosfórico 85%), sendo este mantido em repouso por 12 horas e depois filtrado e armazenado em frasco âmbar revestido por papel alumínio. Em seguida fez-se uma diluição da amostra do homogeneizado de fígado de 1:5, sendo utilizados 20 µL desta com 400 µL de reagente de Bradford completando o volume com água para 2.000 µL. As leituras foram realizadas a 595 nm após 12 minutos da adição do reagente de Bradford.

4.5.2. Determinação do estresse oxidativo: Determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A análise do estresse oxidativo foi feita pela determinação dos produtos resultantes da peroxidação lipídica (BUEGE; AUST, 1978).

Inicialmente preparou-se o reagente TBARS utilizando 15% de ácido tricloroacético (TCA), 0,375% de ácido tiobarbitúrico (TBA) e ácido clorídrico a 0,25N. Este reagente foi armazenado em frasco âmbar revestido por papel alumínio a 4°C.

Em seguida foram acrescentados 1.000 µL do reagente de TBARS em 100 µL do homogeneizado de fígado, sendo a mistura agitada em vórtex por 5 segundos, e em seguida aquecida por 15 minutos em banho-maria a 80° C com posterior resfriamento. O preparado foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm em temperatura ambiente, sendo então retirado o sobrenadante para a leitura espectrofotométrica a 535 nm. O branco foi feito substituindo a amostra por 100 µL do tampão Tris 0,01 M, pH 7,4.

4.5.3. Mecanismo de Defesa do Organismo

4.5.3.1. Atividade da superóxido dismutase

As superóxido dismutases catalisam a reação de dois ânions superóxido, com a consequente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase e a glutathiona peroxidase.

O princípio do método para determinação da SOD é baseado na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Uma vez que não se consegue determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, se utiliza a quantificação em unidades relativas, sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm (MARKLUND, 1985).

A atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. Na reação foram utilizados 20 μL de homogeneizado de fígado, 8 μL de pirogalol 24 mmol/L e 4 μL de catalase 30 $\mu\text{mol/L}$, completando para 200 μL com tampão Tris a 0,01 M (pH 7,4). O branco continha todos os reagentes exceto a amostra e o pirogalol.

A variação de absorbância foi acompanhada a 420 nm pelo leitor de microplaca, sendo a placa incubada por 5 minutos a 37°C antes da leitura.

Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína, sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol (MARKLUND, 1985).

4.5.3.2. Avaliação da Expressão da Proteína HSP 70

4.5.3.2.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com SDS-PAGE, utilizando o método proposto por Laemmli (1970). Utilizou-se o sistema de eletroforese vertical mini gel (Loccus do Brasil Ltda.) em voltagem constante de 100 Volts por duas horas e 30 minutos. Quantidades conhecidas (30 µg) de proteína total das amostras e de um padrão de referência (Prestained SDS-Page Standards, Broad Range – Bio-Rad Laboratories) foram aplicadas ao gel. A amostra foi preparada utilizando-se uma alíquota de aproximadamente 24 µl do homogeneizado de fígado, adicionando-se 8 µL de tampão de amostra quatro vezes concentrado (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20% glicerol, 4% SDS; 0,002% azul de bromofenol e 4 µL de β-mercaptoetanol). Antes de serem aplicadas no gel, as amostras congeladas a – 20°C foram fervidas por 4 min, e imediatamente imersas em gelo.

4.5.3.2.2. Análise por “Western Blotting”

Após a separação em gel de bis-acrilamida-SDS, as proteínas foram eletroforéticamente transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare). A transferência ocorreu por uma hora e 30 minutos a 4°C em amperagem constante (0,35 A) e 90 V, usando o módulo interno para western blot da Loccus do Brasil Ltda. A transferência foi avaliada colocando-se o gel em solução corante por uma hora, sendo em seguida colocado em solução descorante por 12 horas.

Após várias lavagens com tampão TBS (10mM tris, pH 7,5, 100mM NaCl), os sítios de interação não-específicos foram bloqueados usando a solução de bloqueio (50 mL de TBS 10X e 5% de leite em pó desnatado), a 4°C, deixando-a agitar por duas horas a temperatura ambiente, com agitação constante (aproximadamente 70 rpm). Em seguida desprezou-se a solução de bloqueio e a membrana foi submetida a três lavagens consecutivas com 50 mL

de TBS-T (TBS 1X acrescido de 0,1% de Tween 20), com agitação de 15 minutos cada.

As membranas foram incubadas por 12 horas a temperatura ambiente com anticorpo monoclonal anti-hsp70 (H-5157, Sigma-Aldrich Brasil Ltda) em 50 ml de TBS-T a 0°C, na diluição de 1:1.000. Após incubação retirou-se a solução de anticorpo primário, sendo então realizadas duas lavagens sob agitação constante com 50 mL de TBS-T por 15 minutos, e por último uma lavagem imediata.

As membranas foram incubadas com um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (A-3562, Sigma-Aldrich Brasil Ltda.), em 50 ml de TBS-T, na diluição de 1:5.000, por quatro horas, a temperatura ambiente e agitação constante. Após nova seqüência de lavagens, conforme descrito anteriormente, colocou-se a membrana sob agitação constante em 45 mL de tampão de fosfatase alcalina (Tris-HCl 1M, pH 9,8; NaCl 5M; MgCl₂ 1M) por 10 minutos. Em seguida a reação de cor foi desenvolvida adicionando-se 16,50 µL de cloreto de nitro-azul de tetrazólio (NBT) e 8,25 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato p-toluideno (BCIP) (Invitrogen Brasil Ltda.) em 10 mL de tampão de fosfatase alcalina, agitando por alguns segundos até aparecer a formação das bandas. Após lavagem com água deionizada, as membranas foram secas e mantidas ao abrigo da luz.

4.5.3.2.3. Extração do RNA

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen Brasil Ltda.). Foram pesados aproximadamente 100 mg de fígado, o qual foi macerado continuamente em nitrogênio líquido e acrescido de 1 mL de trizol. Transferiu-se o homogeneizado para um microtubo incubando-o por 5 minutos em temperatura ambiente, sob agitação. Após a lise das células, o RNA foi extraído com 200 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) e centrifugado a 12.000xg por 15 minutos a 4° C. A fase aquosa foi então coletada e adicionada a 500 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.), sendo incubada em temperatura ambiente por 10 minutos agitando a cada três minutos. O RNA foi então precipitado por centrifugação a 12.000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol 75%,

sendo então centrifugado a 9.500xg por 5 minutos. Em seguida descartou-se o etanol 75% e o sedimento foi incubado em temperatura ambiente para evaporação de todo etanol. Por último, o sedimento foi ressuscitado em 50 µL de água DEPC (água miliq tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato, Invitrogen Brasil Ltda., autoclavada duas vezes) e armazenado a – 20°C.

4.5.3.2.3.1. Quantificação do RNA

Amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria, com o uso do acessório nanocell (Modelo Evolucion 60 da Thermo Cientific).

O espectrofotômetro foi previamente zerado em relação à absorvância da água (branco), sendo em seguida aplicado sobre o nanocell 1 µL das amostras de RNA (diluídas na proporção de 1: 5 com água DEPC) obtendo-se os valores de absorvância em dois comprimentos de onda: 260 nm, (comprimento de onda ótimo para leitura de RNA/DNA) e 280 nm (ótimo para leitura de proteínas). A concentração de RNA assim como a absorvância e a relação entre A260 e A280 foram expressas automaticamente no espectrofotômetro.

A concentração do RNA é obtida da seguinte forma:

$[RNA(\mu g/\mu L)] = A \times A_{260} \times \text{diluição}$, onde A é uma constante de cada substância e é definida como a capacidade intrínseca do material analisado de absolver luz em um determinado comprimento de onda. No caso do RNA o valor desta constante é 40. A260 é a leitura da absorvância da amostra no comprimento de onda de 260 nm. Diluição corresponde a quantas vezes a amostra foi diluída para ser feita a leitura.

4.5.3.2.3.2. Avaliação da pureza e integridade do RNA

A pureza das amostras foi obtida determinando-se a relação entre os valores de absorvância nos comprimentos de onda 260 (A260), correspondente aos ácidos nucleicos (DNA e RNA), e 280 (A280), correspondente às proteínas.

A relação ótima entre A260/ A280 para RNA deve estar na faixa de 1,8 a 2,0, sendo que valores abaixo disso significam amostra com quantidade elevada de proteína, o que pode interferir nos resultados.

A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, sendo aplicado em cada canaleta 1 µL de RNA para 1 µL de tampão de carregamento (0,1 M de EDTA pH 8,0, 30% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xileno cianol), deixando correr a 90 V por 90 minutos em tampão TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM de ácido bórico, 2 mM EDTA).

4.5.3.2.4. Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen Brasil Ltda.). Inicialmente 2 µg de RNA foram tratados com 2 µL de DNase (Invitrogen Brasil Ltda.) e 1 µL de tampão completando o volume com água DEPC até 10 µL. A mistura foi incubada durante 15 minutos em temperatura ambiente para ação da enzima DNase. Em seguida foi adicionado 1 µL de EDTA para inativação da enzima, deixando a reação durante 8 minutos em banho-maria a 65°C e posteriormente no gelo.

Acrescentou-se a mistura 1 µL de oligo dT a 100 µM e 1 µL de dNTPs a 10 µM (Invitrogen Brasil Ltda), sendo em seguida incubada por 5 minutos a 65°C. Colocou-se novamente a mistura no gelo e foram acrescentados 7 µL do mix (4 µL tampão 5x FF, 2 µL de DTT 0,1M e 1 µL de RNase Out). Em seguida a mistura foi colocada em banho-maria a 37°C acrescentado em cada reação 1 µL de MMLV reverse transcriptase deixando no banho por 1 hora. Para inativar a enzima colocou-se o cDNA a 70°C durante 10 minutos.

O cDNA foi quantificado por espectrofotometria, com o uso do acessório nanocell (Modelo Evolucion 60 da Thermo Cientific). Em seguida o cDNA foi armazenado a – 20°C até a reação de amplificação por PCR em tempo real.

4.5.3.2.5. Quantificação dos transcritos por transcrição reversa seguida de PCR em tempo real

Utilizou-se o aparelho *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) para execução do experimento. Baseado nos valores de Ct (*Cycle threshold*), que é o ponto em que a fluorescência aumenta apreciavelmente acima da fluorescência do ruído, foi analisado a quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak (2001). A detecção foi realizada

pelo Reagente *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems), sendo o gene da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) utilizado como controle interno para quantificação do gene alvo (HSP 70). O par de iniciadores da proteína HSP 70 (senso e antisenso) foram desenhados utilizando o programa *Primer3 plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), de acordo com os requisitos para PCR em tempo real.

As amostras foram analisadas em duas repetições biológicas, quantificadas em corridas independentes, sendo cada amostra avaliada em duplicata em cada placa de reação.

Inicialmente fez-se uma adequação de todas as amostras de cDNA para a concentração de 1,5 µg/µl. Subsequentemente foram feitos ensaios para a determinação da eficiência da reação. Os componentes para cada reação foram 2µL de cDNA, 6,0 µL de 2X *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystem) e iniciadores nas concentrações 400 nM. O teste de eficiência foi realizado em diluições seriadas de 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625 do cDNA, além de uma amostra concentrada deste. Para o cálculo da eficiência da reação foi utilizada a fórmula: Eficiência PCR= $(10^{(1/\text{coeficiente angular da reta})} - 1) \times 100$.

As reações foram preparadas para se obter um volume final de 12 µl, sendo constituída de: 2 µl do cDNA; 2,4 µl da mistura dos iniciadores a 2,0 µM (senso e antisenso) e 6 µl do reagente *Sybr Green*. Os controles negativos (NTC) foram feitos substituindo-se as amostras de cDNA pelo mesmo volume de água na reação. Os iniciadores utilizados nesta reação estão listados na tabela 3.

As condições de amplificação para todos os genes foram 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 seg e anelamento e extensão a 60°C durante 30 seg. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para elaboração da curva de dissociação. As amostras foram aquecidas com incremento de 1°C durante 30 seg, partindo de 60°C até atingir o limite de 94°C.

Tabela 3- Iniciadores utilizados no PCR em Tempo Real

Nome	Iniciador 1 (5' – 3')	Iniciador 2 (3' – 5')
GAPDH	AGGTTGTCTCCTGTGACTTC	CTGTTGCTGTAGCCATATTC
HSP70	AGGCCAACAAAGATCACCATC	TAGGACTCGAGCGCATTCTT

4.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão. Utilizou-se o Sistema para Análise Estatística – SAEG, versão 9.1 – 2007 da Universidade Federal de Viçosa, para análise descritiva dos dados e para os testes de comparação de grupos independentes.

Para avaliação da distribuição das variáveis foi realizado o teste de Kolmogorov-Sminorv, sendo aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-wallis em comparações de variâncias múltiplas e o teste de Wilcoxon para comparação de dois grupos independentes quando as distribuições não apresentaram normalidade.

Para as variáveis que apresentaram distribuição normal foi realizada análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey para variáveis múltiplas e o teste T para dois grupos independentes. O nível de significância adotado foi de 95% com valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Consumo alimentar, peso corporal e índice hepatossomático.

O consumo alimentar dos animais após 24 horas de tratamento não apresentou diferença significativa pelo teste de Tukey com $p < 0,05$ (tabela 4), mostrando que a inclusão de polpa de manga na dieta teve boa aceitação pelos animais.

No experimento de 24 horas os animais não apresentaram diferença significativa quanto ao peso corporal, sendo este tempo insuficiente para alterar o peso dos animais (tabela 4).

Tabela 4 – Consumo alimentar e peso corporal dos animais durante o período experimental de 24 horas.

Grupos	Ingestão (g)	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Ganho de Peso (g)
Controle	14,43 ± 3,17 ^A	83,83 ± 8,28 ^B	94,67 ± 5,61 ^C	10,83 ± 3,66 ^D
Manga 3%	11,66 ± 4,15 ^A	80,33 ± 12,74 ^B	88,83 ± 12,11 ^C	8,50 ± 1,87 ^D
Manga 10%	14,23 ± 3,30 ^A	77,33 ± 13,40 ^B	91,83 ± 8,82 ^C	14,50 ± 5,96 ^D
Vitamina E	13,45 ± 3,83 ^A	81,50 ± 16,74 ^B	92,66 ± 14,68 ^C	11,16 ± 3,31 ^D

Valores com letras iguais na mesma coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A análise do ganho de peso não seguiu distribuição normal, sendo aplicado o teste não paramétrico de Kruskal – wallis, onde o poder do teste é de 7,81 em $p = 0,05$ (poder do teste encontrado: 4,37)

Os animais que receberam as dietas experimentais por um período de 25 dias não apresentaram diferença significativa quanto à ingestão da dieta (tabela 5), demonstrando que a suplementação com polpa de manga Ubá, mesmo em concentrações elevadas (10%), não alterou o consumo alimentar.

Tabela 5 - Consumo alimentar semanal (g) dos animais durante o período experimental de 25 dias.

Grupos	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana
Controle	18,95 ± 1,07 ^D	20,01 ± 0,54 ^C	19,18 ± 0,62 ^B	21,11 ± 2,19 ^A
Manga 3%	19,68 ± 0,86 ^D	19,90 ± 0,95 ^C	20,68 ± 1,30 ^B	21,21 ± 2,92 ^A
Manga 10%	20,33 ± 1,75 ^D	20,08 ± 0,11 ^C	20,60 ± 0,79 ^B	20,67 ± 2,73 ^A
Vitamina E	19,78 ± 0,50 ^D	19,68 ± 0,64 ^C	20,34 ± 0,96 ^B	21,09 ± 1,71 ^A

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

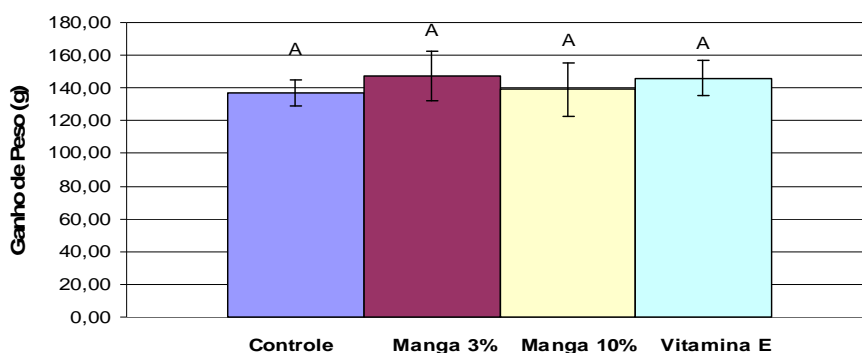
No presente estudo observou-se que todos os animais do experimento de 25 dias apresentaram peso corporal médio equivalente durante a fase de adaptação e na primeira semana após o início da ingestão da dieta experimental. Na segunda semana os animais que receberam a dieta suplementada com vitamina E apresentaram maior peso corporal que o controle. Os animais que receberam a dieta com 3% de manga, apresentaram peso médio significativamente maior que o controle, na segunda (161,33g \pm 24,77 e 191,40g \pm 5,85, respectivamente) e também na terceira semana (235,20g \pm 9,01 e 205,50g \pm 23,90, respectivamente). No entanto, na última semana do período experimental o peso médio dos animais foi equivalente (tabela 6). Portanto, não houve diferença significativa no ganho ponderal dos animais, demonstrando que a suplementação da dieta com 3% e 10% de polpa de manga, não exerceram efeito sobre o ganho de peso dos animais (figura 2).

Tabela 6. Evolução semanal do peso corporal (g) dos animais do experimento de 25 dias.

Grupos	PI	P1	P2	P3**	PF
Controle	94,5 \pm 24,95 ^A	129,67 \pm 32,94 ^B	161,33 \pm 24,77 ^D	205,50 \pm 23,90 ^F	231,50 \pm 24,08 ^G
Manga 3%	107,50 \pm 9,09 ^A	146,83 \pm 15,50 ^B	191,40 \pm 5,85 ^C	235,20 \pm 9,01 ^E	254,20 \pm 12,03 ^G
Manga 10%	101,83 \pm 8,25 ^A	141,33 \pm 7,50 ^B	179,66 \pm 6,89 ^{CD}	222,00 \pm 13,31 ^{EF}	240,83 \pm 12,86 ^G
Vitamina E	104,50 \pm 7,94 ^A	146,50 \pm 11,55 ^B	186,33 \pm 13,39 ^C	227,67 \pm 12,09 ^{EF}	250,50 \pm 12,60 ^G

Médias seguidas de letra igual na mesma coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Em P2* houve diferença significativa entre os subgrupo controle e os subgrupos manga 3% e vitamina E. Na 3ª semana (P3**) houve diferença significativa entre os subgrupos controle e manga 3%.

PI: Peso inicial; P1: Peso na primeira experimental; P2: Peso na segunda semana experimental; P3: Peso na terceira semana experimental; PF: Peso final.



Médias \pm desvio padrão seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 2. Ganho de peso corporal dos animais em 25 dias de experimento.

O peso corporal maior nos animais que receberam a dieta suplementada com 3% de polpa de manga, na segunda e terceira semana experimental, assim como o maior peso dos animais tratados com dieta suplementada com vitamina E, na segunda semana, não está relacionado à densidade calórica da dieta e nem ao consumo alimentar, uma vez que não houve diferença nestes dados. Portanto, percebe-se que as dietas suplementadas com 3% de polpa de manga e vitamina E otimizaram o ganho de peso dos animais quando estes estavam em fase de crescimento, não apresentando a mesma eficácia com o aumento da idade.

Estudos demonstram que os antioxidantes podem desempenhar ação na digestão, absorção e biodisponibilidade dos nutrientes. Estes compostos desempenham várias ações no organismo animal, como modificação da microbiota intestinal, melhora na digestibilidade e na absorção dos nutrientes, modificações morfo-histológicas do trato gastrointestinal e melhora da resposta imune, não estando ainda claro o modo de ação para essas múltiplas funções (BOTSOGLOU *et al.*, 2002; BRUGALLI, 2003). Em estudo anterior com peixe, observou-se que misturas de ervas medicinais com poder antioxidante adicionadas à dieta na proporção de 0,5% resultou em aumento de peso significativo ($p < 0,05$) comparado ao controle (SEUNG-CHEOL *et al.*, 2007). Em experimentos com leitões, a inclusão na dieta de 0,75% de uma combinação de extratos vegetais, na primeira semana pós-desmame, promoveu maior ganho de peso dos animais em relação aos que receberam a dieta controle (26 g/dia e 5 g/dia, respectivamente), no entanto esta suplementação durante outros períodos não interferiu significativamente no ganho ponderal dos animais (JEAUROND *et al.*, 2002).

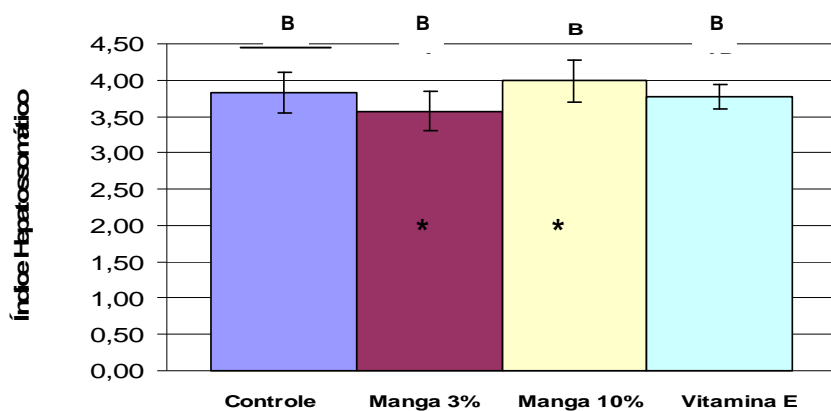
Apesar de todos os benefícios provenientes das substâncias com capacidade antioxidante, pode-se ressaltar que algumas como os polifenóis, desempenham o papel de quelantes de nutrientes, como ferro, cálcio, aminoácidos e proteínas no trato gastrointestinal, tendo sido durante décadas denominadas compostos anti-nutricionais, estando o seu consumo elevado (suplementação) associado à redução da biodisponibilidade de outros nutrientes (DREOSTI, 2000). Portanto, devido ao elevado teor de polifenóis na polpa de manga Ubá essa quando ingerida em grande quantidade, pode não alterar o ganho de peso, como ocorreu nos animais que receberam a dieta com

10% de manga, ou até mesmo levar a uma diminuição do peso corporal quando ingerida em maiores concentrações. Diante disto, percebe-se que a concentração de antioxidantes da dieta pode exercer efeito tanto positivo quanto negativo sobre o peso corporal dos animais em fase de crescimento.

Além da análise dos pesos dos animais no decorrer do experimento, avaliou-se também a relação entre o peso hepático e o corporal (índice hepatossomático) com o intuito de verificar se as diferentes concentrações de polpa de manga na dieta poderiam interferir sobre o metabolismo hepático.

$$\text{Índice hepatossomático} = (\text{Peso do Fígado} \div \text{Peso Corporal}) \times 100$$

Todos os animais do experimento de 25 dias não apresentaram diferença no índice hepatossomático pelo teste de Tukey com $p < 0,05$ (figura 3), porém considerando o valor de $p < 0,1$ verificou-se que os animais que receberam a dieta com 3% de polpa de manga apresentaram diminuição significativa do índice hepatossomático quando comparado aos que receberam a dieta suplementada com 10% manga. No entanto, uma vez que não houve diferença significativa dos dois tratamentos em relação ao controle, não podemos afirmar que esses exerceram efeitos sobre o fígado de acordo com esse parâmetro.



Média do índice hepatossomático com nível de significância de $p = 0,07819$. Médias \pm desvio padrão seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). * Em $p < 0,1$ houve diferença significativa entre Manga 3% e Manga 10%.

Figura 3 - Índice hepatossomático dos animais no experimento de 25 dias.

Estudos anteriores avaliando diferentes concentrações de resíduos industriais de manga em ração para peixe verificaram que o farelo do caroço e semente de manga a 10%, 20% e 30% da dieta por 12 semanas (OMOREGIE, 2001) e o farelo de casca e bagaço fibroso da polpa prensada a 5%, 10% e 15% da dieta por nove semanas (LIMA, 2010) não interferiram no índice hepatossomático dos animais. Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, onde não houve diferença neste parâmetro entre os animais tratamentos com 3% e 10% de polpa de manga em relação ao controle.

5.2. Parâmetros bioquímicos séricos

Foram avaliados os níveis séricos de colesterol total, colesterol-HDL, triacilglicerol e glicose.

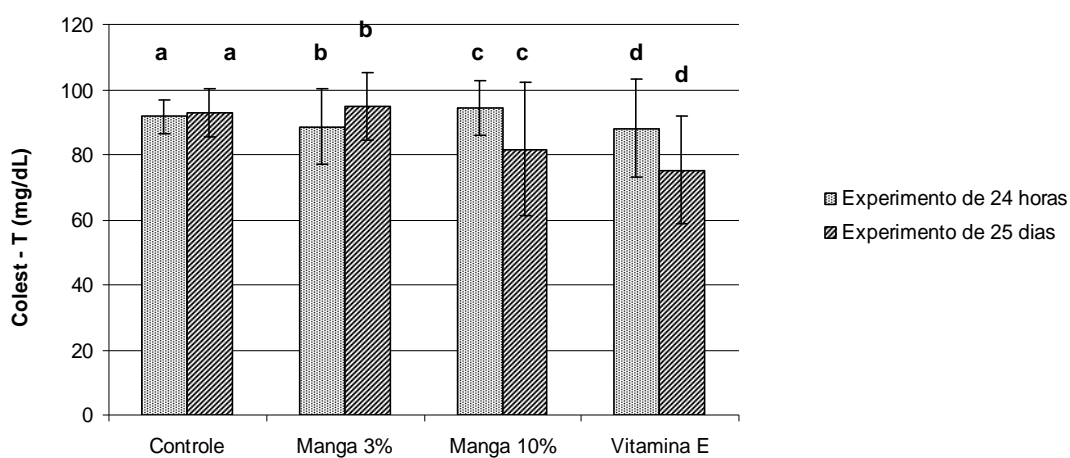
Os animais que receberam as dietas por 24 horas não apresentaram diferença significativa nos parâmetros bioquímicos avaliados, sendo o tempo de 24 horas recebendo as diferentes dietas experimentais insuficientes para alterar estes parâmetros. No entanto, esses dados foram relevantes para que fossem utilizados como valores de referência destes parâmetros em ratos wistar derivados do Biotério Central do CCB da UFV, uma vez que esses valores podem variar de acordo com os diferentes locais de obtenção dos animais (tabela 7, 8 e 9).

Os parâmetros colesterol total (tabela 7 e figura 4) e HDL-c (tabela 8 e figura 5) não foram diferentes significativamente entre os animais que receberam as dietas tanto de forma aguda quanto crônica, demonstrando que nas condições testadas a ingestão de dietas suplementadas com polpa de manga não interfere nestes parâmetros mesmo após a ingestão por 25 dias estando estes valores dentro da faixa de referência que é de 40,00 a 130,00 mg/dL para colesterol total (HARKNESS; WAGNER, 1993; CUBAS *et al.*, 2007) e $48,00 \pm 11,4$ mg/dL para HDL-c (DANTAS *et al.*, 2006).

Tabela 7. Níveis de colesterol total sérico (mg/dL) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.

Grupos	Colest – T (24 horas)	Colest- T (25 dias)
Controle	91,68 ± 15,26 ^B	92,77 ± 10,33 ^A
Manga 3%	88,43 ± 11,58 ^B	92,77 ± 7,36 ^A
Manga 10%	94,50 ± 8,43 ^B	81,61 ± 20,43 ^A
Vitamina E	88,01 ± 15,09 ^B	75,25 ± 16,45 ^A

Médias ± desvio padrão seguidas de letra igual na mesma coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), onde no experimento de 24 horas o valor de $p =$ INS (insignificante) e no de 25 dias $p = 0,0928$.



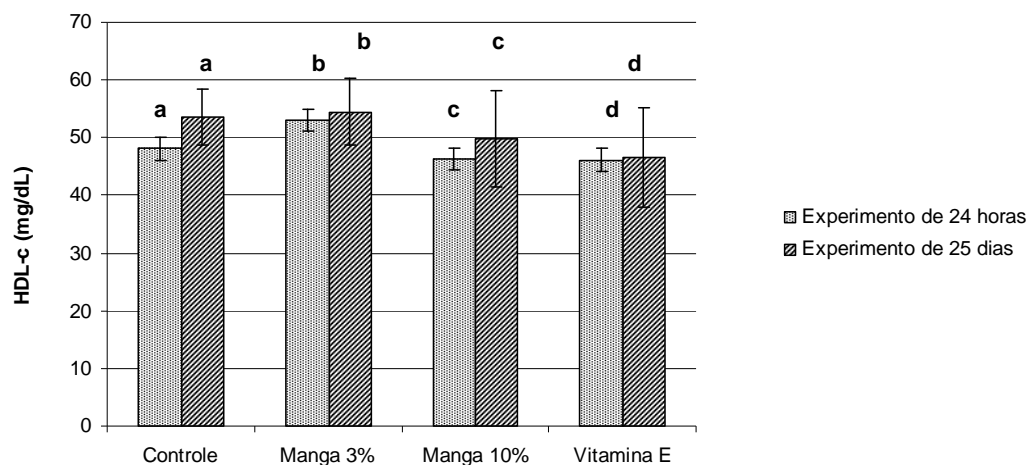
Comparação entre as médias ± desvio padrão do experimento de 24 horas e 25 dias, onde a média de cada grupo com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si em $p < 0,05$, segundo o teste T. a: $p = 0,6744$ b: $p = 0,4562$ c: $p = 0,1839$ d: $p = 0,1915$

Figura 4. Níveis de colesterol total sérico (mg/dL) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.

Tabela 8 – Níveis de HDL-c sérico (mg/dL) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.

Grupos	HDL-c (24 horas)	HDL-c (25 dias)
Controle	48,08 ± 7,85 ^A	53,62 ± 4,87 ^B
Manga 3%	53,05 ± 5,19 ^A	54,47 ± 5,78 ^B
Manga 10%	46,32 ± 3,87 ^A	49,72 ± 8,30 ^B
Vitamina E	46,07 ± 6,48 ^A	46,63 ± 8,60 ^B

Médias \pm desvio padrão seguidas de letra igual na mesma coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), onde no experimento de 24 horas o valor de $p = 0,2835$ e no de 25 dias $p = 0,2252$.



Comparação entre as médias \pm desvio padrão do experimento de 24 horas e 25 dias, onde a média de cada subgrupo com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si em $p < 0,05$, segundo o teste T. a: $p = 0,2306$ b: $p = 0,6647$ c: $p = 0,9169$ d: $p = 0,9000$

Figura 5. Níveis de HDL-c sérico (mg/dL) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.

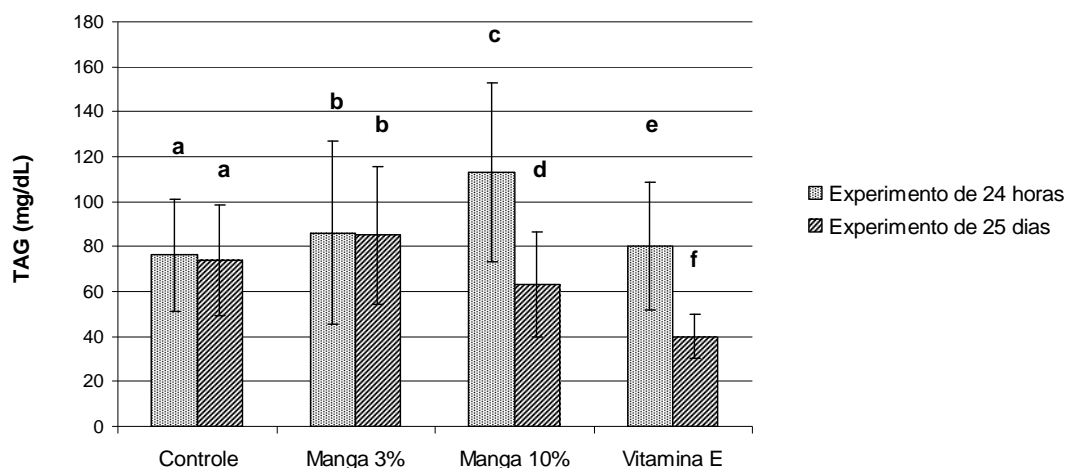
Com relação aos níveis séricos de triacilgliceróis percebe-se que não houve diferença significativa entre os animais que receberam a dieta por 24 horas ($p = 0,2679$), porém após receber a dieta experimental por 25 dias os animais do grupo vitamina E apresentaram níveis de triacilgliceróis significativamente menor que o grupo manga 3%, no entanto esses dois subgrupos, assim como o de manga 10%, não diferiram do controle, demonstrando que os três tratamentos não exerceram ação sobre os níveis séricos de triacilgliceróis dos animais ($p = 0,0395$) estando estes valores dentro da faixa de referência que é de 26,00 a 145,00 mg/dL (HARKNESS; WAGNER, 1993; CUBAS *et al.*, 2007) (tabela 9).

De acordo com os dados encontrados para os níveis séricos de TAG em dois diferentes períodos de ingestão das dietas (24 horas e 25 dias) percebe-se que houve uma diminuição significativa do teor de triacilgliceróis nos grupos manga 10% ($p = 0,0253$) e vitamina E ($p = 0,014$), demonstrando que o consumo crônico destas dietas pode levar a uma diminuição deste parâmetro (figura 6).

Tabela 9 – Níveis de triacilgliceróis séricos (mg/dL) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.

Grupos	TAG (24 horas)	TAG (25 dias)
Controle	76,25 ± 24,82 ^C	73,88 ± 24,62 ^{AB}
Manga 3%	86,20 ± 40,90 ^C	85,02 ± 30,43 ^A
Manga 10%	113,10 ± 39,98 ^C	63,42 ± 23,36 ^{AB}
Vitamina E	80,23 ± 28,20 ^C	40,07 ± 9,68 ^B

Médias ± desvio padrão seguidas de letra igual na mesma coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), onde no experimento de 24 horas o valor de $p = 0,2679$ e no de 25 dias $p = 0,0395$.



Comparação entre as médias ± desvio padrão do experimento de 24 horas e 25 dias, onde a média de cada grupo com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si em $p < 0,05$, segundo o teste T. a: $p = 0,8716$ b: $p = 0,9558$ c, d: $p = 0,0253$ e, f: $p = 0,0142$

Figura 6. Níveis de triacilglicerol sérico (mg/dL) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.

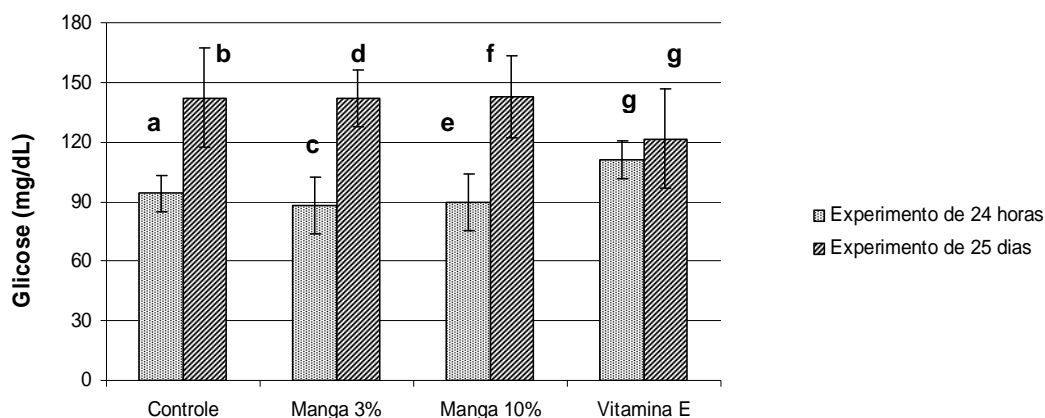
De acordo com os valores presentes na tabela 10 e figura 7, percebe-se que a glicemia de jejum apresentou uma elevação significativa ao se comparar os animais de 24 horas com os de 25 dias (controle: $p = 0,0495$; manga 3%: $p = 0,0015$ e manga 10%: $p = 0,0154$), com exceção do grupo vitamina E ($p = 0,8455$), porém este aumento não está relacionado à dieta experimental, uma vez que os animais que ingeriram a dieta controle também apresentaram elevação deste parâmetro, podendo este ser justificado pelo aumento da idade dos animais, pois na primeira avaliação estes eram recém desmamados,

enquanto na segunda eram adultos jovens. Os animais do experimento de 24 apresentaram valores de glicemia dentro da faixa de referência que é de 50,00 a 135,00 mg/dL (HARKNESS; WAGNER, 1993; CUBAS *et al.*, 2007), no entanto nos animais do experimento de 25 dias estes encontraram-se elevados, não sendo, porém os tratamento responsáveis por esta variação, pois os animais controle também apresentaram valores acima da referência.

Tabela 10 – Níveis de glicose sérica (mg/dL) dos animais nos experimento de 24 horas e 25 dias sob jejum de 12 horas.

Grupos	GLic (24 horas)	Glic (25 dias)
Controle	94,20 ± 9,14 ^A	142,30 ± 25,14 ^B
Manga 3%	87,88 ± 14,33 ^A	142,16 ± 14,35 ^B
Manga 10%	84,80 ± 8,51 ^A	142,84 ± 20,44 ^B
Vitamina E	110,94 ± 9,39 ^A	121,52 ± 25,13 ^B

Médias ± desvio padrão seguidas de letra igual na mesma coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), onde no experimento de 24 horas o valor de $p = 0,0864$ e no de 25 dias $p = \text{INS}$ (insignificante).



Comparação entre as médias ± desvio padrão do experimento de 24 horas e 25 dias, onde a média de cada grupo com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si em $p < 0,05$, segundo o teste T. a, b: $p = 0,0495$; c, d: $p = 0,0015$; e, f: $p = 0,0154$; g: $p = 0,8455$

Figura 7. Níveis de glicose sérica (mg/dL) dos animais nos experimentos 24 horas e 25 dias.

Punithavathi e Prince (2010) avaliou por 14 dias o efeito do pré-tratamento com os antioxidantes, quercetina (10 mg/Kg do animal/dia) e tocoferol (10 mg/Kg do animal/dia), sobre o metabolismo lipídico em ratos

wistar, os quais tiveram indução de infarto do miocárdio devido a administração, por dois dias alternados, de 100 mg/Kg de isoproterenol (droga associada ao aumento de lipídeos plasmático e peroxidação lipídica). No estudo verificou-se que tanto a quercetina quanto o tocoferol reduziram os níveis de colesterol, triacilgliceróis e ácidos graxos livres no plasma e fígado, além de aumentar a atividade da lecitina colesterol acil transferase (LCAT). Possivelmente a ação dos compostos bioativos se deve a habilidade destes em inibir a atividade da HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima-A) redutase, principal enzima responsável pela regulação do metabolismo do colesterol, limitando a sua biossíntese, além de aumentar a atividade da LCAT, enzima responsável pela conversão do colesterol em ésteres de colesterol nas superfícies das lipoproteínas de alta densidade (HDLs)

Ao contrário dos resultados encontrados por outros autores, não foi verificado neste estudo diferença quanto aos parâmetros bioquímicos avaliados. Entretanto demonstrou-se que o teor de triacilgliceróis apresentou diminuição significativa nos grupos manga 10% e vitamina E ao se comparar os animais que receberam a dieta por 24 horas com os que a receberam por 25 dias, sendo este dado semelhante ao encontrado por Punithavathi e Prince (2010). Portanto, percebe-se que estas duas dietas ao longo prazo podem exercer efeito benéfico ao organismo, embora esses valores tenham sido significativamente iguais ao controle.

5.3. Avaliação da hepatotoxicidade e do estresse oxidativo

5.3.1. Enzimas relacionadas à integridade hepática

Neste estudo foi avaliado o nível sérico das enzimas hepáticas, AST, ALT e GGT, para verificar se a suplementação da dieta com 10% de manga devido ao alto teor de bioativos poderia exercer atividade pro-oxidante no fígado, lesando as membranas dos hepatócitos e conseqüentemente aumentando a concentração plasmática dessas enzimas.

A alteração no nível e atividade de enzimas no organismo animal pode pressupor alterações teciduais. O dano nos hepatócitos causado por patologias ou outras situações que leva ao estresse hepático, pode ser verificado pelo

aumento sérico de três enzimas, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e gama glutamil transpeptidase, estando estas, portanto relacionadas à integridade hepática (TENNANT, 1997).

A alanina aminotransferase (ALT), também conhecida como transaminase glutâmica pirúvica sérica (TGP) é uma enzima presente unicamente nos hepatócitos. Quando há lesão celular, a ALT atinge a corrente sanguínea e seus níveis séricos podem ser mensurados, sendo um aumento drástico no seu nível o melhor indicador de lesões hepáticas agudas.

A aspartato aminotransferase (AST) também chamada de transaminase glutâmica oxalacética sérica (TGO) é uma enzima citoplasmática e mitocondrial, que se encontra associada às células parenquimais do fígado, hemácias, músculos esqueléticos e cardíacos. Portanto, apesar de estar aumentada na lesão hepática aguda, não é uma enzima específica do fígado por ser encontrada em outros tecidos (TENNANT, 1997).

A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto que 80% da AST encontra-se presente na mitocôndria. Assim as alterações nos valores séricos dessas enzimas auxiliam no diagnóstico e no prognóstico de doenças hepáticas. Em danos hepatocelulares leves a forma predominante no soro é a citoplasmática, enquanto que em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (MOTTA, 2003).

De acordo com Moncorvo et al. (1998) o nível aumentado da ALT é relativamente específico da doença hepatobiliar, enquanto o aumento dos níveis de AST em valores de dez vezes acima do limite superior de variação normal reflete normalmente uma patologia hepática ou biliar. Dessa forma os valores das aminotransferases são úteis para monitorizar a evolução da hepatopatia parenquimal aguda ou crônica.

A gama glutamil transpeptidase (GGT ou gama GT) é uma enzima de membrana, associada a numerosos tecidos (MEYER *et al.*, 1995) como fígado, rins, pâncreas e intestino. Mesmo que a GGT esteja presente em muitos tecidos, elevações na sua atividade sérica são observadas primariamente em desordens hepáticas (TENNANT, 1997).

Na tabela 11 verifica-se que houve diferença significativa nos níveis séricos da enzima AST entre os animais que receberam a dieta suplementada

com 3% de polpa de manga e os que receberam a dieta controle por 24 horas, sendo os valores da mediana igual a 106 U/L e 516 U/L respectivamente ($p < 0,05$). Os animais que receberam a dieta por 25 dias não apresentaram diferença significativa nos valores da mediana de acordo com o teste de Kruskal-wallis.

A figura 8 mostra a comparação entre valores de AST nos dois períodos de ingestão da dieta. Percebe-se que os animais controle ($p = 0,0251$) e vitamina E ($p = 0,0223$) que receberam a dieta de forma crônica apresentaram diminuição significativa nos níveis de AST aos que receberam a mesma dieta de maneira aguda ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa nesta comparação nos animais que receberam a dieta suplementada com 3% ($p = 0,6164$) e 10% de manga ($p = 0,0873$).

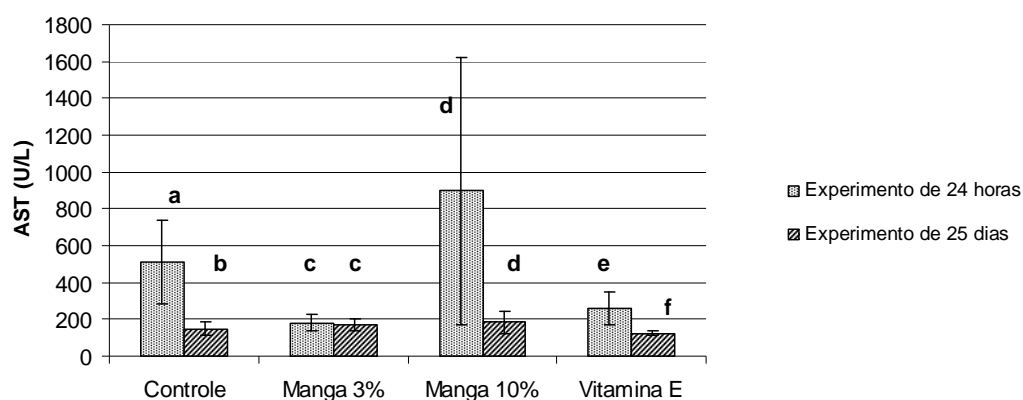
Diante dos dados obtidos neste estudo percebe-se que a concentração de polpa de manga na dieta parece interferir nos valores de AST, uma vez que a dieta com 3% de manga provocou uma redução significativa no nível plasmático desta enzima quando comparado ao controle e, ao contrário desta, a dieta suplementada com 10% de polpa de manga tendeu a elevar os valores da AST. Portanto de acordo com os resultados pode-se pressupor que a ingestão de 3% de manga na dieta exerce ação antioxidante no organismo enquanto que uma suplementação superior a utilizada no estudo, ou seja, acima de 10% de polpa de manga poderá vir a desencadear efeito pro-oxidativo em vários órgãos, uma vez que estas enzimas estão presentes no fígado, hemácias, músculos esqueléticos e cardíacos dos animais.

Apesar dos animais, tanto no experimento de 24 horas quanto no de 25 dias, não terem sido induzidos a nenhum tipo de estresse, estes independentes do tratamento e inclusive o controle, apresentaram níveis de AST sérico muito acima dos valores citados por Cubas et al. (2007), e por Dantas et al. (2006), que variam de 39,00 a 92,00 mg/dL e 69,3 a 92,7 U/L, respectivamente.

Tabela 11. Concentração sérica da aspartato aminotransferase (U/L) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.

Grupos	Controle	Manga 3%	Manga 10%	Vitamina E
AST (24h)				
Média	508,20 ± 226,91	180,80 ± 46,08	897,40 ± 724,58	261,20 ± 89,96
*Mediana	506,00 ^A	166,00 ^B	971,00 ^{AB}	238,00 ^{AB}
Amplitude	503,00	112,00	1.707,00	237,00
V. Mín / V. Máx	265,00 / 768,00	147,00 / 259,00	160,00 / 1.870,00	172,00 / 409,00
CV%	44,65	25,48	80,74	34,44
AST (25 dias)				
Média	149,40 ± 35,82	167,80 ± 30,87	183,00 ± 60,12	124,20 ± 14,65
*Mediana	138,00 ^C	160,00 ^C	217,00 ^C	123,00 ^C
Amplitude	80,00	80,00	118,00	40,00
V. Mín / V. Máx.	115,00 / 195,00	126,00 / 206,00	115,00 / 233,00	107,00 / 147,00
CV%	23,98	18,40	32,85	11,80

* O valor do teste no experimento de 24 horas (8,46) e 25 dias (4,49) foi obtido segundo o teste não paramétrico de Kruskal-wallis, onde os valores da mediana na mesma linha com letra igual não diferem entre si em $p \leq 0,05$. CV%= Coeficiente de Variação; V. Mín / V. Máx: Valor Mínimo / Valor Máximo.



Comparação entre as médias ± desvio padrão do experimento de 24 horas e 25 dias, onde a média de cada grupo com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si em $p < 0,05$ pelos seguintes testes:

a, b; c; d, e: Valor de p segundo o teste T. a, b: $p = 0,0251$; c: $p = 0,6164$; e, f: $p = 0,0283$
 f, g: Valor de p segundo o teste não paramétrico de Wilcoxon. d: $p = 0,0873$.

Figura 8. Concentração sérica da aspartato aminotransferase (U/L) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.

Os valores de ALT (tabela 12) não apresentaram diferença significativa entre os animais que receberam a dieta por 24 horas de acordo com o teste de Kruskal-wallis. No entanto após ingestão crônica das dietas percebe-se que o grupo vitamina E apresentou uma diminuição significativa quanto aos animais que receberam a dieta com 10% de manga ($p < 0,05$), porém esses valores foram significativamente iguais ao grupo manga 3% e controle. Portanto, mesmo havendo diferença entre os grupos vitamina E e manga 10% percebe-se que todos os tratamentos exerceram o mesmo efeito nos animais, uma vez que os valores de ALT foram iguais estatisticamente ao controle pelo teste de Kruskal-wallis ($p < 0,05$).

Ao se comparar os valores de ALT nos dois períodos de ingestão percebe-se que houve uma diminuição significativa nos grupos controle e vitamina E, segundo o teste de Tukey em $p < 0,01$ ($p = 0,0082$ e $p = 0,0008$, respectivamente), enquanto que no de manga 3% a diferença foi em $p < 0,05$ ($p = 0,01367$) e no de manga 10% em $p < 0,1$ ($p = 0,07123$) de acordo com o teste de Wilcoxon (figura 9).

Diante dos resultados obtidos percebe-se que os animais que receberam a dieta suplementada com 10% de polpa de manga apresentaram concentração sérica de ALT significativamente maior que os animais que receberam a dieta suplementada com vitamina E, porém os valores de ALT nestes dois subgrupos, assim como no manga 3%, foram iguais ao controle demonstrando que estes três tratamentos exerceram o mesmo efeito sobre o fígado dos animais.

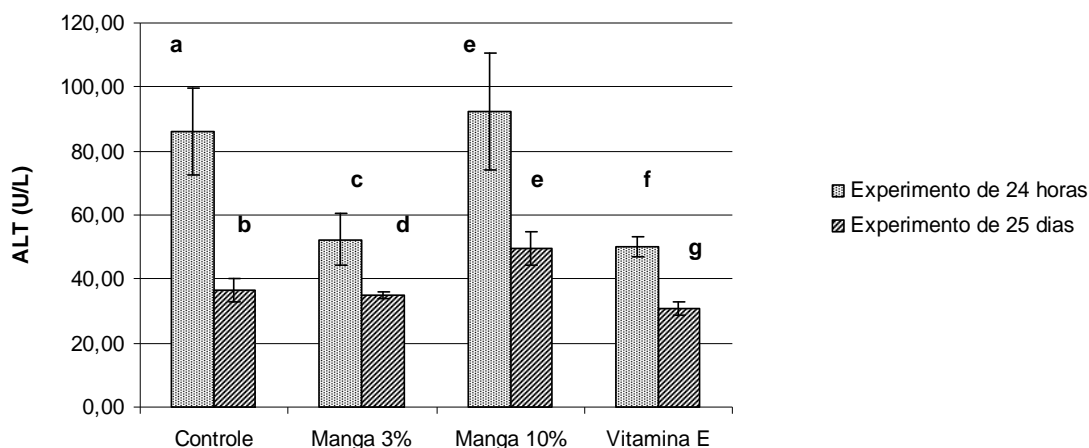
Os animais do experimento de 24 horas apesar de não terem sido induzidos a nenhum tipo de estresse, especialmente o controle e os suplementados com 10% de polpa de manga, apresentaram níveis séricos de ALT (88,00 U/L e 104,00 U/L, respectivamente) muito acima dos valores citados por Cubas et al. (2007), e por Dantas et al. (2006), que variam de 17,00 a 50,00 mg/dL e 38,7 a 63,3 U/L, respectivamente. Já os animais do experimento de 25 dias apresentaram concentração sérica de ALT semelhantes aos valores de referência.

Tabela 12. Concentração sérica da alanina aminotransferase (U/L) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.

Grupos	Controle	Manga 3%	Manga 10%	Vitamina E
ALT (24h)				
Média	86,00 ± 30,58	52,40 ± 18,34	92,40 ± 41,26	50,20 ± 6,98
*Mediana	88,00 ^C	43,00 ^C	104,00 ^C	52,00 ^C
Amplitude	79,00	41,00	95,00	16,00
V. Mín / V. Máx	53,00 / 152,00	35,00 / 76,00	40,00 / 135,00	41,00 / 57,00
C V%	35,56	34,40	44,65	13,90
ALT (25 dias)				
Média	36,60 ± 8,02	35,00 ± 1,87	49,60 ± 11,74	30,80 ± 4,44
*Mediana	33,00 ^{AB}	34,00 ^{AB}	51,00 ^A	29,00 ^B
Amplitude	20,00	4,00	29,00	10,00
V. Mín / V. Máx	29,00 / 40,00	33,00 / 37,00	32,00 / 61,00	26,00 / 36,00
C V%	21,90	5,34	23,66	14,41

* O valor do teste no grupo de 24 horas (6,42) e 25 dias (6,89) foi obtido segundo o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde os valores das medianas com a mesma letra em cada linha não diferem em $p \leq 0,05$ (valor do teste em $p=0,05$ é de 7,810 e em $p=0,01$ é de 11,340,).

V. Mín / V. Máx: Valor Mínimo / Valor Máximo; C V %: Coeficiente de variação



Comparação entre as médias ± desvio padrão do experimento de 24 horas e 25 dias, onde a média de cada grupo com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si em $p < 0,05$ pelos seguintes testes:

a, b; f, g: Valor de p segundo o teste T. a, b: $p = 0,0082$; f, g: $p = 0,0008$

c, d; e: Valor de p segundo o teste não paramétrico de Wilcoxon. c, d: $p = 0,01367$; e: $p = 0,07123$

Figura 9. Concentração sérica da alanina aminotransferase (U/L) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.

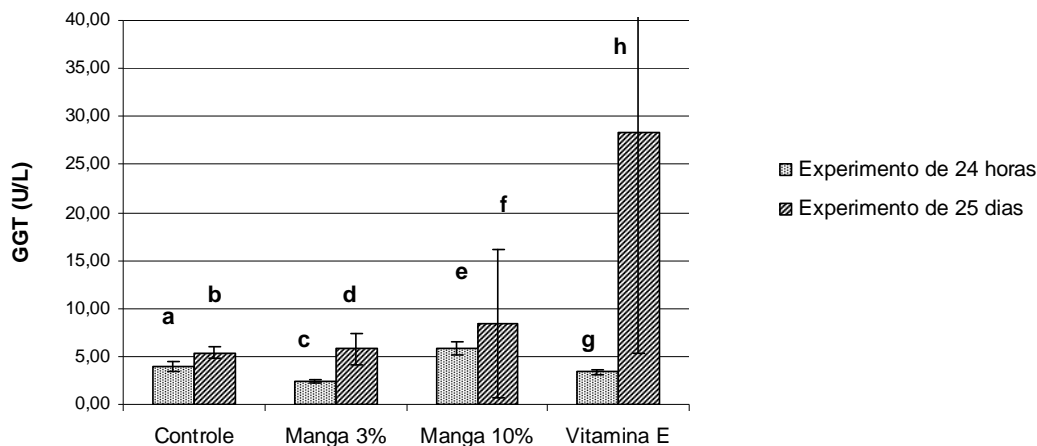
Ao avaliar os valores séricos de GGT entre os animais que receberam a dieta por 24 horas percebe-se que o grupo manga 10% apresentou valor significativamente maior que o grupo manga 3%, porém semelhante ao grupo controle e vitamina E, segundo o teste de Kruskal-wallis ($p < 0,05$). Os animais que receberam a dieta por 25 dias não apresentaram diferença significativa entre eles de acordo com o teste de Kruskal-Wallis (tabela 13).

No presente estudo verificou-se que o nível plasmático da GGT tende a aumentar com a idade, visto que os animais jovens (grupo de 25 dias) apresentaram maiores níveis desta enzima quando comparado aos recém-desmamados (grupo de 24 horas), sendo este aumento significativo nos quatro subgrupos, principalmente nos animais que receberam a dieta com vitamina E ($p = 0,00391$), demonstrando que esta suplementação pode ter exercido ação sobre os tecidos onde ocorre maior concentração da GGT, como o hepático, levando ao aumento do seu nível sérico (figura 10).

Tabela 13. Concentração sérica da gama-glutamilttransferase (U/L) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.

Grupos	Controle	Manga 3%	Manga 10%	Vitamina E
GGT (24h)				
Média	4,00 ± 1,22	2,40 ± 0,55	5,80 ± 1,64	3,40 ± 0,55
**Mediana	4,00 ^{AB}	2,00 ^B	5,00 ^A	3,00 ^{AB}
Amplitude	3,00	1,00	4,00	1,00
V. Mín / V. Máx	3,00 / 6,00	2,00 / 3,00	4,00 / 8,00	3,00 / 4,00
C V%	30,61	22,82	28,33	16,10
GGT (25 dias)				
Média	5,40 ± 0,55	5,80 ± 1,64	8,40 ± 7,77	28,40 ± 23,02
**Mediana	5,00 ^B	5,00 ^B	6,00 ^B	33,00 ^B
Amplitude	1,00	4,00	19,00	52,00
V. Mín / V. Máx	5,00 / 6,00	4,00 / 8,00	3,00 / 22,00	5,00 / 57,00
C V%	10,14	28,33	92,44	81,05

** O valor do teste no experimento de 24 horas (12,41) e 25 dias (2,62) foi obtido segundo o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde os valores com a mesma letra em cada linha não diferem entre si em $p \leq 0,05$ (valor do teste em $p = 0,05$ é de 7,810 e em $p = 0,01$ é de 11,340,).



Comparação entre as médias do experimento de 24 horas e 25 dias, onde a média de cada grupo com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si em $p < 0,05$ pelos seguintes testes:

a, b ; c, d: Valor de p segundo o teste T. a, b: $p = 0,0479$; c, d: $p = 0,0023$

e, f ; g, h: Valor de p segundo o teste não paramétrico de Wilcoxon. e, f: $p = 0,4580$; g, h: $p = 0,00391$

Figura 10. Comparação da concentração da gama-glutamil aminotransferase dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.

A dosagem da concentração das enzimas ALT, AST e da GGT permitem averiguar a presença de alterações da permeabilidade dos hepatócitos pela elevação de ALT e AST, assim como de desordens colestáticas pela elevação de GGT. A amplitude do aumento da concentração de uma determinada enzima em particular, geralmente, está correlacionada ao número de células hepáticas afetadas. A lesão do hepatócito, normalmente está associada a certo grau de colestase, independentemente das possíveis causas (inflamatória, degenerativa ou neoplásica), uma vez que os canalículos biliares podem ficar obstruídos em consequência da dilatação das células hepáticas (MONCORVO *et al.*, 1998).

Lee *et al.*, 2003 demonstraram, *in vivo* que a quercetina, exerce ação hepato protetora e antifibrinogênica contra o indutor de injúria, a dimetilnitrosamina (DMN), onde a administração diária de quercetina (10 mg/kg) durante quatro semanas preveniu a perda de peso corporal, inibiu a elevação dos níveis séricos da alanina e aspartato aminotransferases e diminuiu os níveis hepáticos de malondialdeído.

De acordo com o presente estudo a suplementação das dietas com 3% e 10% polpa de manga e com 150 mg de vitamina E/ Kg de dieta, assim como o período de ingestão de 24 horas e 25 dias demonstraram exercer efeito sobre os teores séricos das enzimas relacionadas à integridade hepática, uma vez que os animais que receberam a dieta suplementada com 3% de polpa de manga por um período de 24 horas apresentaram menores níveis plasmáticos de AST e GGT quando comparado aos que receberam a dieta controle e manga 10%, respectivamente. Além disso, os animais que receberam a dieta suplementada com 10% de polpa de manga por 25 dias apresentaram níveis elevados de ALT quando comparado aos que receberam a dieta com vitamina E. De acordo com os dados obtidos percebe-se ainda que após uma ingestão aguda das respectivas dietas experimentais, todos os animais apresentaram altos níveis plasmáticos de ALT e AST, sendo estes reduzidos após 25 dias de consumo da dieta, no entanto, ao contrário destas enzimas, a GGT teve seus níveis séricos elevados após o consumo crônico da dieta.

5.3.2. Peroxidação lipídica hepática

Esta análise foi determinada pela formação de malondialdeído (MDA), produto secundário da oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, através do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A concentração de malondialdeído foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar $E_0 = 1,56 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BUEGE; AUST, 1978), sendo os resultados expressos em nmol de MDA por miligramas de proteína em homogeneizado de fígado.

Inicialmente quantificou-se a proteína total do homogeneizado de fígado, segundo o método de Bradford (tabela 14).

Tabela 14 - Concentração de proteína total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) do homogeneizado de fígado dos animais nos experimento de 24 horas e 25 dias.

Grupos	PTN (24 horas)	PTN (25 dias)
Controle	6,67 \pm 0,64 ^{A a}	5,46 \pm 1,71 ^{B a}
Manga 3%	7,48 \pm 0,96 ^{A b}	5,87 \pm 1,27 ^{B c}
Manga 10%	7,26 \pm 0,96 ^{A d}	5,19 \pm 1,03 ^{B e}
Vitamina E	6,09 \pm 1,27 ^{A f}	6,27 \pm 1,42 ^{B f}

Médias \pm desvio padrão dos experimentos de 24 horas e 25 dias seguidas de letra igual não diferem de acordo com os testes de Tukey ($p= 0,1141$ e $p=$ insignificante, respectivamente).

Comparação entre as médias do experimento de 24 horas e 25 dias, onde a média de cada grupo com a mesma letra não diferem entre si segundo o teste T: a: $p= 0,1533$; b, c: $p= 0,0239$; d, e: $p= 0,0049$; f: $p= 0,8226$

O presente estudo demonstrou não haver diferença significativa nos valores da mediana de MDA/PTN de acordo com o teste de Kruskal-wallis em $p < 0,05$ (tabela 15).

Ao analisar a diferença entre o teor de MDA/PTN nos animais que receberam a dieta com 10% de polpa de manga por 24 horas com os que receberam esta mesma dieta por 25 dias percebe-se que houve uma diminuição significativa ($p= 0,0081$) da peroxidação lipídica ao longo do tempo (figura 11). Isso sugere que possa ter ocorrido no organismo uma resposta contra o excesso de antioxidante presente nesta dieta havendo um mecanismo de compensação ou adaptação protegendo os lipídios da ação desses bioativos. No entanto, houve diferença significativa nos valores da média de MDA/PTN dos animais que receberam a dieta suplementada com 10% de manga em relação aos que receberam as dietas controle e manga 3% de acordo com o teste de Tukey em $p < 0,01$ ($p= 0,0000$) (tabela 15).

Os teores de MDA/PTN no grupo manga 3% tanto em 24 horas quanto em 25 dias de ingestão da dieta não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Já os animais que receberam a dieta suplementada com vitamina E por 25 dias apresentou maiores valores deste parâmetro em relação ao controle (tabela 15).

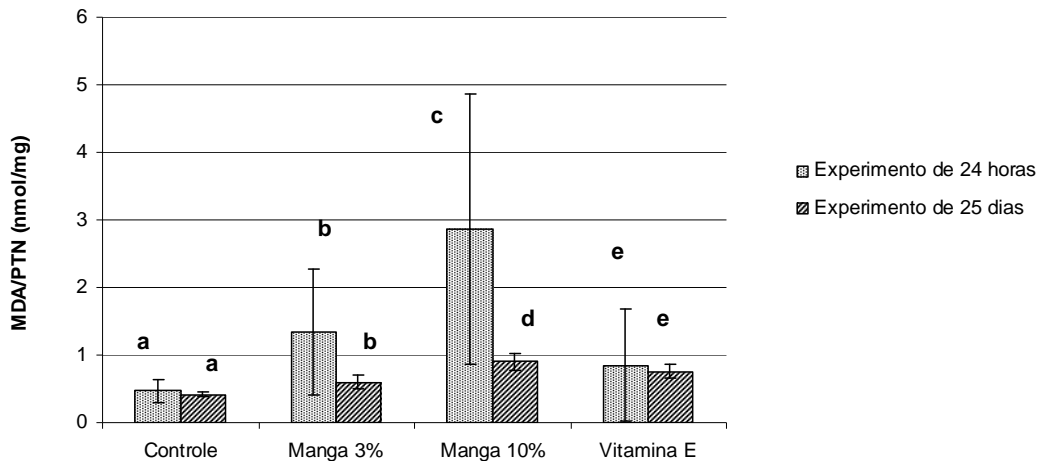
Tabela 15 – Concentração de malondialdeído (nmol/mg de proteína) no homogeneizado de fígado dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.

Grupos	Controle	Manga 3%	Manga 10%	Vitamina E
MDA/PTN (24 h)				
Média	0,472 ± 0,17	1,34 ± 0,93	2,87 ± 2,00	0,851 ± 0,827
*Mediana	0,505 ^A	1,31 ^A	2,36 ^A	0,46 ^A
Amplitude	0,388	1,79	4,58	1,70
V. Mín / V. Máx	0,246 / 634	0,478 / 2,27	1,10 / 5,68	0,391/ 2,09
C V%	35,36	69,57	69,66	97,19
MDA/PTN (25 dias)				
**Média	0,418 ± 0,04 ^C	0,596 ± 0,10 ^{BC}	0,899 ± 0,13 ^A	0,758 ± 0,10 ^{AB}
Mediana	0,404	0,513	0,781	0,711
Amplitude	0,095	0,264	0,340	0,244
V. Mín / V. Máx	0,368 / 0,463	0,450 / 0,714	0,770 / 1,11	0,604 / 0,848
C V%	9,92	17,31	14,64	13,95

• *MDA/PTN (24 h): Valores da mediana seguido da mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde o valor do teste varia de 7,81 (p=0,05) a 11,34 (p=0,01), sendo o valor encontrado igual a 6,81. Aplicando-se o teste de Tukey obteve p= 0,0632, sendo o valor de MDA dos animais manga 10% significativamente maior que o controle em p< 0,1, porém não em p< 0,05 .

• **MDA/PTN (25 dias): Valores da média ± desvio padrão seguido da mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey com p< 0,01 (valor de p= 0,0000).

No presente estudo verificou-se que a suplementação de 150 mg de vitamina E/Kg de dieta consumida por 25 dias provocou peroxidação lipídica hepática, visto que houve diferença significativa de MDA/PTN entre os animais que receberam esta dieta e os que receberam a controle durante este período. Este dado pode estar relacionado à quantidade de α -tocoferol presente na dieta dos animais (3 vezes a recomendação diária), a qual demonstrou ser suficiente para exercer ação pro-oxidativa no fígado. A dieta suplementada com 10% de polpa de manga parece apresentar um efeito pro-oxidativo ainda maior visto que levou ao aumento da concentração de MDA/PTN tanto em 24 horas (significativo em p<0,1) quanto em 25 dias, sendo neste último diferente significativamente do controle e de manga 3% (p< 0,05), demonstrando que o excesso de antioxidante pode causar prejuízo hepático.



Comparação entre as médias \pm desvio padrão do experimento de 24 horas e 25 dias, onde a média de cada grupo com a mesma letra não diferem entre si pelos seguintes testes:

a: Valor de p segundo o teste T. a: $p=0,4423$;

b; c, d; e: Valor de p segundo o teste não paramétrico de Wilcoxon. b: $p=0,1253$; c, d: $p=0,0081$; e: $p=0,3007$

Figura 11. Concentração de malondialdeído (nmol/mg de proteína) em homogeneizado de fígado dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.

Em experimento *in vitro* utilizando fibroblastos de ratos, no qual administrou a droga adriamicina demonstrou-se que a suplementação com vitamina E provocou efeito protetor contra a peroxidação lipídica, além de estimular a atividade da superóxido dismutase (SOD) nas células, sendo este efeito alcançado em concentrações de $300\mu\text{M}$ de vitamina E enquanto não houve nenhuma melhora quando expostos a $100\mu\text{M}$ (VANILLA *et al.*, 1997; THABREW *et al.*, 1999). O presente estudo, ao contrário do anterior, demonstrou que a suplementação da dieta tanto com vitamina E como com polpa de manga a 10% exercerem efeito pro-oxidativo ao fígado dos animais experimentais.

5.4. Mecanismo de Defesa Antioxidante de Ratos Tratados com Polpa de Manga Ubá

5.4.1. Atividade da superóxido dismutase

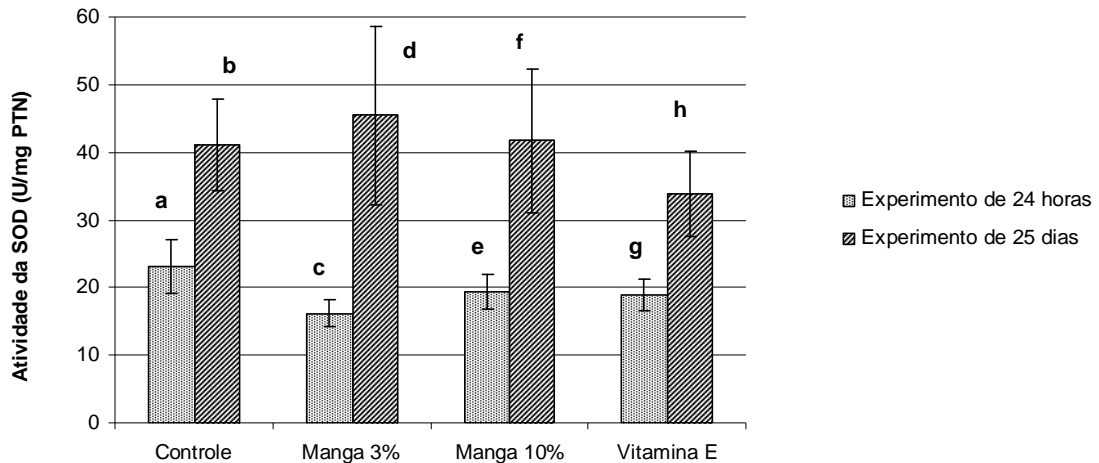
Ao analisar os resultados da atividade da SOD percebe-se que houve uma diminuição significativa desta entre os animais que receberam dieta suplementada com 3% de polpa de manga liofilizada e os que receberam dieta controle por um período de 24 horas. Não houve diferença neste parâmetro entre os animais que consumiram as dietas experimentais por 25 dias (tabela 16).

A figura 12 demonstra que houve um aumento significativo na atividade da SOD nos animais que receberam a dieta por 25 dias em comparação com os que receberam as mesmas dietas por 24 horas, segundo o teste de Tukey ($p < 0,01$).

Tabela 16 - Atividade da superóxido dismutase hepática (U/mg de PTN) dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias.

Grupos	SOD/PTN (24 horas)	SOD/PTN (25 dias)
Controle	23,09 ± 3,95 ^A	41,16 ± 6,81 ^B
Manga 3%	16,17 ± 1,95 ^B	45,41 ± 13,26 ^B
Manga 10%	19,37 ± 2,63 ^{AB}	41,70 ± 10,70 ^B
Vitamina E	18,87 ± 2,27 ^{AB}	33,87 ± 6,36 ^B

Médias ± desvio padrão dos experimentos de 24 horas e 25 dias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com os testes de Tukey ($p = 0,01120$ e $p = 0,3292$ respectivamente).



Comparação entre as médias \pm desvio padrão do experimento de 24 horas e 25 dias, onde a mesma letra em cada grupo não diferem entre si pelo teste de Tukey em $p < 0,01$: a, b: $p = 0,0009$; c, d: $p = 0,0019$; e, f: $p = 0,0011$; g, h: $p = 0,0082$

Figura 12. Atividade da superóxido dismutase em homogeneizado de fígado de ratos nos experimentos 24 horas e 25 dias.

Estudos observaram que a vitamina E pode inibir a NADPH oxidase de fagócitos, levando à diminuição da produção de EROs, e que na deficiência desta vitamina ocorre maior produção dessas espécies reativas e queda das defesas antioxidantes enzimáticas, SOD e GPX (BENEDITO, 1996).

Estudo com ratos demonstrou o efeito da dieta rica em antioxidante sobre a defesa antioxidante enzimática, onde a suplementação com 5 mg de licopeno proveniente de tomate e goiaba vermelha provocaram diminuição dos valores de SOD e CAT nos grupos que receberam dietas de cafeteria (NUNES, 2003). Assim como neste estudo o presente trabalho verificou menor atividade da SOD nos animais que receberam a dieta suplementada com 3% de polpa de manga em relação ao controle por um período de 24 horas.

Ao se comparar os valores da atividade da SOD entre os animais que ingeriram a dieta por 24 horas com os que ingeriram a dieta por 25 dias percebe-se que houve um grande aumento deste parâmetro, o qual pode estar relacionado ao longo período de confinamento dos animais, que pode ter exercido um tipo de injúria levando a uma maior produção de radicais livres e conseqüentemente elevando a atividade da SOD. Além disso, este pode ter ocorrido devido ao aumento da idade dos animais, uma vez que o controle,

assim como os três tratamentos provocaram a mesma elevação da atividade desta enzima.

5.4.2. Expressão da proteína HSP 70

5.4.2.1. Avaliação qualitativa da HSP 70 por *western blotting*

A análise da expressão da HSP 70 por meio da técnica de *western blotting* mostrou que tanto os animais do experimento de 24 horas quanto de 25 dias apresentaram expressão desta proteína, sendo esta considerada constitutiva nas condições experimentais (figura 13 e 14).

Ao analisar as bandas presentes nos grupos que receberam a dieta por 24 horas verifica-se que o grupo controle foi o que apresentou maior intensidade das bandas (figura 13 – A; bandas 1 a 6), enquanto esta foi menor no grupo vitamina E (figura 13 – B; bandas 7 a 12). O grupo manga 3% (figura 13 – A; bandas 7 a 12) pareceu apresentar menor intensidade das bandas comparada ao controle e à manga 10% (figura 13 – B; bandas 1 a 6), sendo, no entanto maior que no subgrupo vitamina E.

A análise da intensidade das bandas da HSP 70, no experimento de 25 dias, não apresentou diferença significativa entre os quatro grupos (figura 14).

Ao comparar as bandas da HSP 70 dos animais do experimento de 24 horas e 25 dias, percebe-se claramente que os animais que receberam a dieta com vitamina E de forma crônica apresentaram maior expressão desta proteína, enquanto que nos que receberam a dieta suplementada com 10% de polpa de manga as bandas foram maiores após a ingestão aguda.

Apesar das diferenças nas intensidades das bandas da HSP 70 serem perceptíveis a olho nu é importante que se avaliem outras técnicas que permita analisar a expressão desta proteína para que se tenha certeza da interferência dos tratamentos aplicados sobre a proteína HSP 70 hepática.

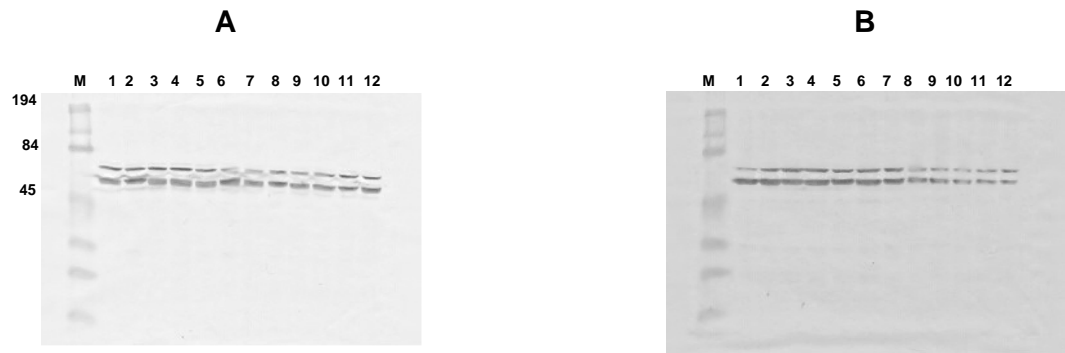


Figura 13. Análise qualitativa da proteína HSP 70 dos animais no experimento de 24 horas: controle e manga 3% (A) e manga 10% e vitamina E (B).

Na figura A os nº de 1 a 6 representam o grupo controle e os de 7 a 12 o grupo manga 3%. Em B os nº de 1 a 6 representam o grupo manga 10% e de 7 a 12 o grupo vitamina E, sendo portanto todos os grupos compostos por seis animais cada. Nas duas figuras a letra M representa o marcador Prestained SDS Page Broad Range (Bio-Rad), sendo os valores ao lado as massas moleculares dos marcadores.

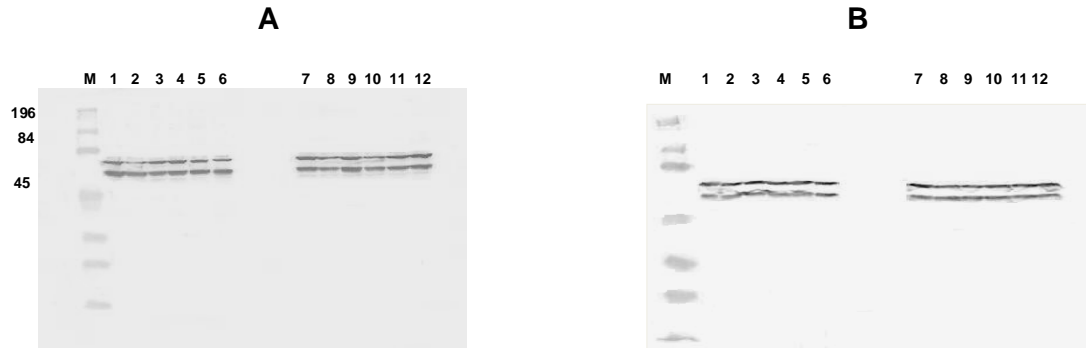


Figura 14. Análise qualitativa da proteína HSP 70 dos animais no experimento de 25 dias: controle e manga 3% (A) e manga 10% e vitamina E (B).

Na figura A os nº de 1 a 6 representam o grupo controle e os de 7 a 12 o grupo manga 3%. Em B os nº de 1 a 6 representam o grupo manga 10% e de 7 a 12 o grupo vitamina E, sendo portanto todos os grupos compostos por seis animais cada. Nas duas figuras a letra M representa o marcador Prestained SDS Page Broad Range (Bio-Rad), sendo os valores ao lado as massas moleculares dos marcadores.

5.4.2.1. Expressão da proteína HSP 70 por RT- PCR em tempo real

Após a obtenção dos RNAs a quantificação foi obtida por espectrofotometria ficando os valores entre 0,462 a 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ nos animais do experimento de 24 horas ($A_{260}/A_{280}= 1,65$ a 2,09) e entre 1,392 a 2,540 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($A_{260}/A_{280}= 2,066$ a 2,555) nos animais do experimento de 25 dias. Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para avaliar a integridade do RNA extraído. De acordo com os géis pode-se observar que a maioria das amostras de RNAs não foram degradadas durante a extração, uma vez que foram obtidas duas bandas do RNA 18S e 28S, sem a presença de arraste (figura 15).

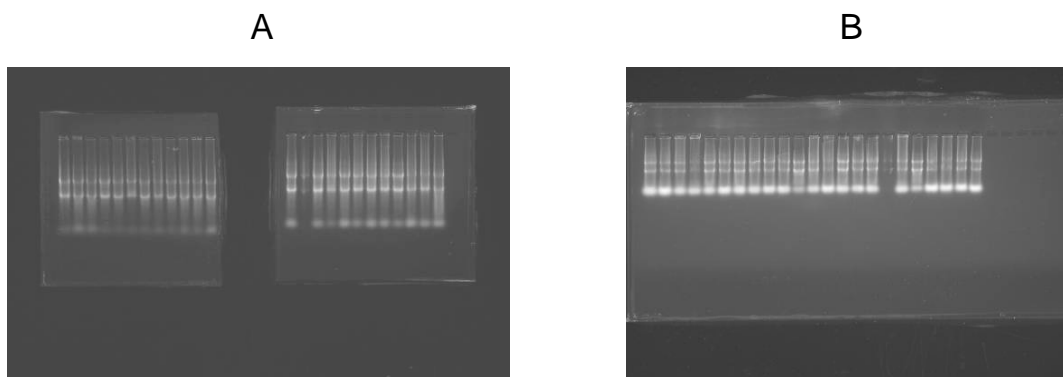


Figura 15: Gel de RNA extraído de fígado dos animais no experimento de 24 horas (A) e 25 dias (B).

A eficiência (E) da PCR em tempo real foi calculada por meio de gráfico onde os valores obtidos de Ct foram dispostos no eixo das ordenadas e o logaritmo dos valores de cada diluição, no eixo das abscissas. A PCR apresenta 100 % de eficiência quando o valor da inclinação da reta se aproxima de -3,32. O valor das eficiências da PCR para o gene alvo, HSP 70, foi de 81,7% (figura 16), enquanto que para o iniciador GAPDH este foi de 94,4% (figura 17). Valores elevados de eficiência validam o experimento e, conseqüentemente, permitem as análises de quantificação de transcrito utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

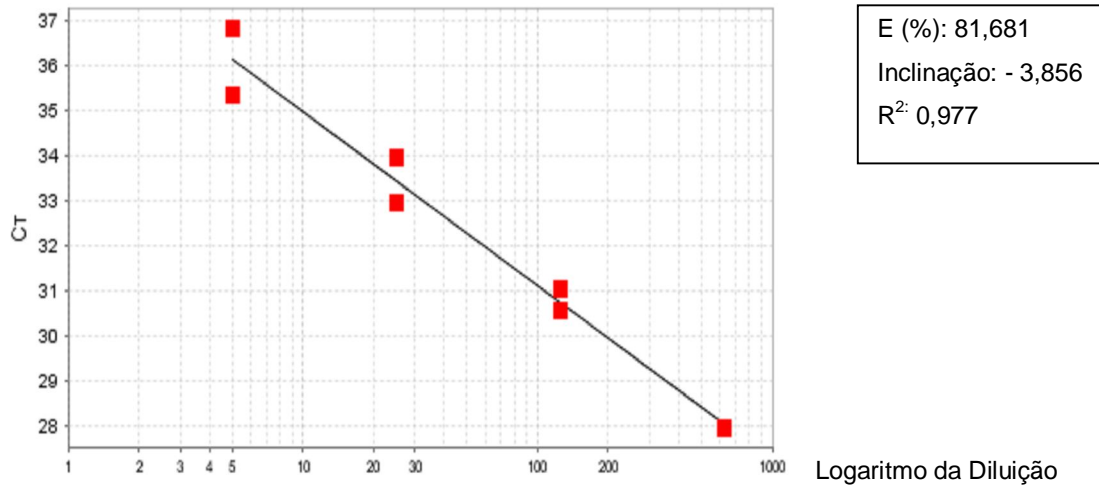


Figura 16. Curva padrão da eficiência da RT-PCR utilizando o gene alvo HSP 70.

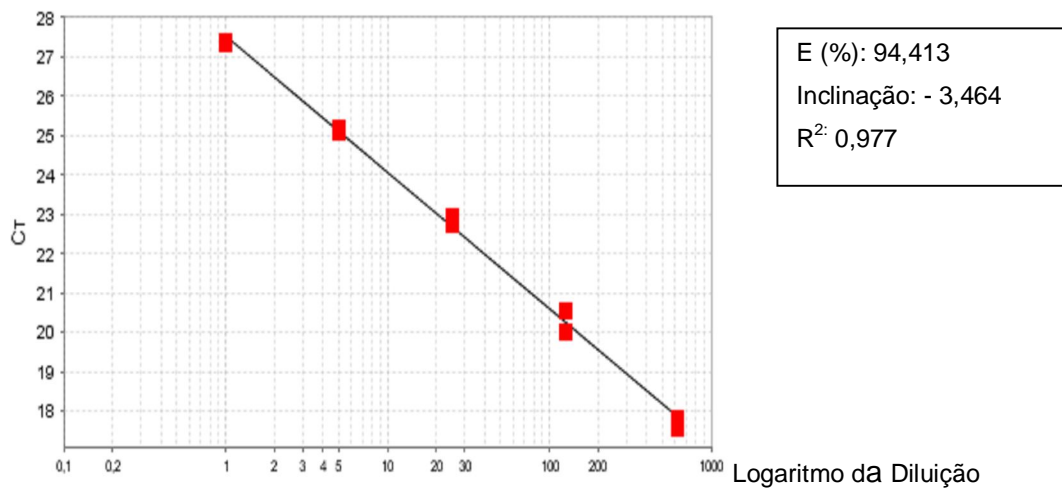


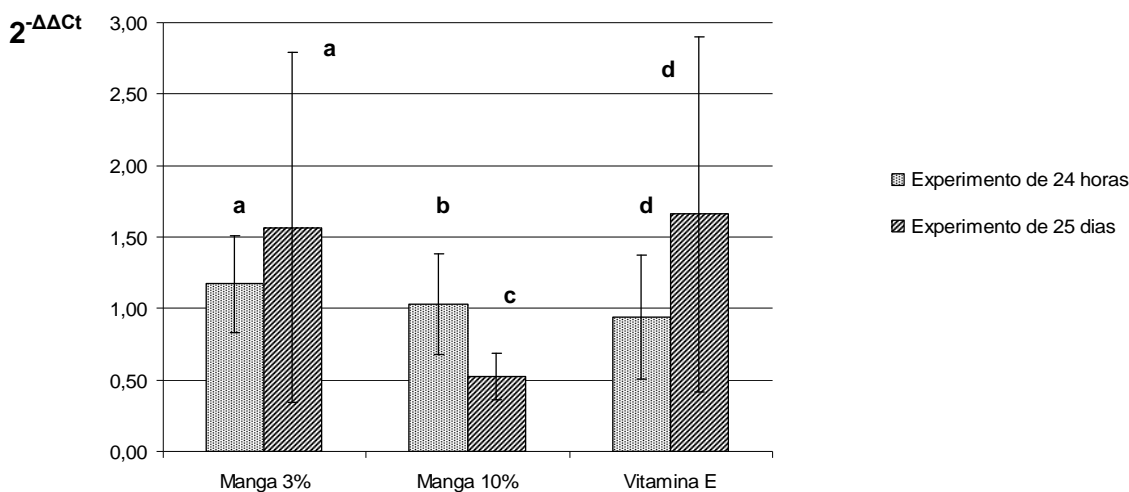
Figura 17. Curva padrão da eficiência da RT-PCR utilizando o gene GAPDH.

O primeiro passo para iniciar os estudos sobre expressão gênica através do RT-PCR em tempo real é a escolha do gene normalizador (endógeno). A escolha de um gene endógeno ótimo para esse tipo de análise é feita com base em sua uniformidade, sendo o GAPDH muito utilizado nestes estudos por não apresentar variação na sua expressão nos tratamentos avaliados. Um gene endógeno (normalizador) ideal não deve ter variações nos níveis de

expressão sob as condições experimentais (RADONIĆ *et al.*, 2004; MCNEILL *et al.*, 2007).

O gene alvo (HSP70) teve seus valores de Ct normalizados em relação ao GAPDH. Uma vez normalizados, os valores de Ct de cada gene tratado foram subtraídos dos valores de Ct do gene não tratado (controle), fornecendo os dados de $\Delta\Delta Ct$, que foram utilizados para calcular os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

A análise dos valores obtidos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (grupo controle: $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$) demonstrou que as diferentes concentrações de polpa de manga e vitamina E nas dietas experimentais, tanto em 24 horas quanto em 25 dias, não interferiram na expressão dos genes HSP 70 hepático, segundo os testes de Tukey e Kruskal-wallis, respectivamente ($p < 0,05$). Na comparação entre os dois períodos de ingestão os animais que receberam a dieta suplementada com 10% de polpa de manga apresentaram diminuição significativa na expressão do gene HSP70 hepático após 25 dias de consumo da dieta, segundo o teste de Tukey em $p < 0,05$ ($p = 0,0202$) (figura 18).



Comparação entre as médias \pm desvio padrão do experimento de 24 horas e 25 dias, onde a mesma letra em cada grupo não diferem entre si pelos testes de Wilcoxon (a: $p = 0,3770$) e Tukey (b, c: $p = 0,0202$; d: $p = 0,2564$) em $p < 0,05$. Grupo controle: $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$

Figura 18. Expressão relativa da proteína HSP 70 dos animais nos experimentos de 24 horas e 25 dias de acordo com os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtidos pela técnica de RT-qPCR.

Há uma relação inversa entre a expressão da HSP70, proteína protetora endógena induzida em resposta as EROs e o teor de vitamina E no organismo, um antioxidante exógeno importante na eliminação das EROs, podendo esta relação ser considerada como uma competição por radicais livres, havendo uma maior expressão desta proteína em deficiência da vitamina E (DIEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2000).

Os efeitos dos componentes da dieta sobre HSPs têm sido estudados em modelos animais. Kelly et al (1996), mostraram que a privação de vitamina E por 16 semanas combinado com o exercício físico por oito semanas induziu a expressão da HSP 72 em ratas. Em estudo *in vitro*, Andres et al (2000) e Andres e Cascales (2002) mostraram que mesmo na presença de EROs, provocadas pela substância ciclosporina A, houve uma diminuição significativa na expressão induzida de HSP 70 em hepatócitos de rato, quando na presença de vitamina E. É interessante, porém, que há relatos anteriores de que a vitamina C, um antioxidante exógeno, provocou um aumento na expressão basal de HSP60 e 70 *in vitro*, mas os seus mecanismos de ação não são conhecidos. Outro estudo demonstrou que a exaustão da vitamina E provocou um aumento significativo na expressão da HSP 32 e 70 em células alveolares e hepáticas, voltando a expressão quase ao normal na resuplementação da vitamina (GHAYOUR-MOBARHAN *et al.*, 2005).

O presente estudo mostrou que a quantidade de antioxidante presente nas dietas suplementada com manga e vitamina E, ingeridas durante 24 horas e 25 dias não foram suficientes para alterar a expressão dos genes HSP70 em relação ao controle. No entanto, a ingestão por 25 dias da dieta com 10% de polpa de manga provocou uma redução significativa na expressão do gene HSP70 em comparação com o consumo desta dieta por 24 horas.

6. CONCLUSÕES

As dietas com diferentes concentrações de polpa de manga, ingeridas tanto de forma aguda quanto crônica não interferiram no ganho de peso e no índice hepatossomático dos animais.

A ingestão de dietas suplementadas com 3% e 10% de polpa de manga Ubá parece interferir sobre as concentrações séricas das enzimas relacionadas a integridade hepática, uma vez que no experimento de 24 horas os animais que receberam a dieta com 3% de polpa de manga apresentaram concentração sérica de AST menor que o controle e de GGT menor que os animais que receberam a dieta com 10% de polpa de manga. Além disso, no experimento de 25 dias os animais que receberam a dieta com 10% de manga apresentaram maior nível sérico de ALT que os animais que receberam a dieta suplementada com vitamina E, sendo, porém, semelhante ao controle.

A análise do marcador de peroxidação lipídica no experimento de 25 dias demonstrou que os animais que receberam a dieta suplementada com 10% de polpa de manga Ubá apresentaram concentração de malondialdeído maior que os animais que receberam a dieta controle e manga 3% o que permiti pressupor que esta suplementação possa ter exercido efeito pro-oxidativo ao fígado.

Os animais que receberam a dieta suplementada com 3% de polpa de manga no experimento de 24 horas apresentaram diminuição da atividade da superóxido dismutase em relação ao controle, porém semelhante aos outros tratamentos.

A expressão do gene HSP 70 em ratos wistar saudáveis não variou com a suplementação da dieta com polpa de manga e com vitamina E.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho indicam que os antioxidante presentes na dieta suplementada com 3 e 10% de polpa de manga Ubá ingeridos de forma aguda e crônica podem interferir sobre os mecanismos de

defesa antioxidante e marcadores de injúrias hepáticos, uma vez que a menor suplementação ingerida por 24 horas diminuiu a concentração da AST e atividade da SOD hepática, enquanto que a ingestão por 25 dias de 10% de polpa de manga aumentou a peroxidação lipídica no fígado de ratos wistar saudáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAVAYA, K., MYERS, M. P., MURPHY, S. P., MORIMOTO, R. I. The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. **Genes & Dev.** v. 6, p. 1153 - 64, 1992.

AJILA, C. M.; NAIDU, K. A.; BHAT, S. G.; RAO, U. J. S. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chem.**, v.105, n. 3, p. 982 - 88, 2007.

AMES, B. N. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of câncer. **Mutat. Res.**, v. 475, p.7 - 20, 2001.

AMORIM, D. D.; TEIXEIRA, A. M.; BOECHAT, C. L.; NETO, A. P. D., ATAÍDE, E. M.; COSTA, A. S. V., Produção e caracterização de frutos de genótipos de mangueira cultivados no leste de Minas Gerais. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura e 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, 2008, Vitória - ES. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Fruticultura e 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, 2008.

ANDRADE, Jr. D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S.A., ANDRADE, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J. Bras Pneumol**; v.31, n.1, p. 60 - 8, 2005.

ANDRES, D.; ALVAREZ, A. M.; DIEZ-FERNANDEZ, C.; ZARAGOZ, A.; CASCALES, M. HSP70 induction by cyclosporine A in cultured rat hepatocytes: effect of vitamin E succinate. **J. Hepatol.** v.33, p.570 – 9, 2000.

ANDRES, D.; CASCALES, M. Novel mechanism of vitamin E protection against cyclosporine A cytotoxicity in cultured rat hepatocytes. **Biochem Pharmacol.** v.64, p. 267–76, 2002.

ANTUNES, V. M.; LAZZARETTI, C.; GAMARO, D. G.; LINDEN, R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, vol. 44, n. 2, 2008.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.** v. 89, p. 27-36, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v.29, n.1, São Paulo Jan./Feb. 2006.

BENEDITO, P. Radicais livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica. **Motriz**, v.2, n.2, 1996.

BERNIZ, P. J. **Avaliação industrial de variedades de manga (*Mangifera indica* L.), para elaboração de néctar.** Viçosa, 1984. 57f. Dissertação - (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 1984.

BOTSOGLOU, N. A., FLOROU-PANERI, P., CHRISTAKI, E. et al. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and iron induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. **British Poultry Sci**, v.43, p.223-230, 2002.

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

BROWN, A. R., MARTIN, R. L., HANSEN, W. J., BECKMARM, R. P., WELCH, W. J. The Constitutive and Stress Inducible Forms of hsp 70 Exhibit Functional Similarities and Interact with One Another in an ATP-dependent Fashion, **J. Cell Biol.**, v. 120, n. 5, p. 1101-1112, 1993.

BRUGALI, I. Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. In SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, Campinas. Anais... Campinas: **Col. Bras. Nutr. Anim.**, p.167-182, 2003.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.** v. 52, p. 302-310, 1978.

BUIJSSE, B.; FESKENS, E. J. M.; SCHLETTWEIN-GSELL, D.; FERRY, M.; KOK, F. J.; KROMHOUT, D. Plasma carotene and alpha-tocopherol in relation to 10-y all-cause and cause-specific mortality in European elderly: the Survey in Europe on Nutrition and the Elderly, a Concerted Action (SENECA). **Am J Clin Nutr.**, v. 82, n. 4, p. 879-86, 2005.

CARDELLO, H. M. A. B.; CARDELLO, L. Teor de vitamina C, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga(*Mangifera indica L.*) var. Haden durante o amadurecimento. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 18, n. 2, 1998.

CATANIA, A. S.; BARROS, DE C. R.; FERREIRA, S. R. G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 53, n. 5, 2009.

CERQUEIRA, M. F.; MEDEIROS, G. M. H.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

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

CUBAS, Z. S., SILVA, J. C. R., CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens medicina veterinária**. São Paulo: Roca. Seção 5: p.432-74, 2007.

DANTAS, J. A., AMBIE, L. C. R., CUMAN, R. K. N., BARONI, S., BERSANI-AMADO, C. A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci Health Sci**, v.28, n.2, p.165-70, 2006.

DIEZ-FERNANDEZ, A.C.; ZARAGOZAI, A.; CASCALES, M. HSP70 induction by cyclosporine A in cultured rat hepatocytes: effect of vitamin E succinate. **J. Hepatol**, p. 570-579, 2000.

DONADIO, L.C. **Variedades brasileiras de manga**. São Paulo. Fundação Editora da UNESP, p. 74, 1996.

DIONELLO, N. J. L.; FERRO, J. A.; MACARI, M.; RUTZ, F.; FURLAN, L. R.; FERRO, M. I. T. Efeito do Estresse Térmico Agudo sobre os Níveis da Proteína e RNA Mensageiro da HSP70, em Fígado e Cérebro de Pintos de Corte de Diferentes Linhagens, **Rev. Bras. Zootec.**, v.30, n.5, p.1506-1513, 2001.

DREOSTI, I.E.. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Nutrition.**, v. 16, n. 7, p. 692-4, 2000.

FARAONI, A. S., RAMOS, A. M., STRINGHETA, P. C. Caracterização da manga orgânica cultivar ubá, **Rev. Bras. Prod. Agroind.**, Campina Grande, v.11, n.1, p.9-14, 2009.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo, **Rev. Ass. Med. Bras.**, v. 43, n.1, p. 61-8, 1997.

FERRO, C. O.; CHAGAS, V. L. A.; OLIVEIRA, M. F.; OLIVEIRA, P. L.; SCHANAIDER, A. Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal, **Rev. Col. Bras.** v.37, n.1, p.031-8, 2010.

FILHO, O. S. A. **Efeito da aplicação pós-colheita do “benomyl”, “thiabendazol” e “hipoclorito” na manga “ubá”**. Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1980, Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Escola Superior de Agricultura de Lavras. Lavras, 1980.

FILHO, W. P. C.; ALVES, H. S.; MAZZEI, A. R. Mercado de manga no Brasil: contexto mundial, variedades e estacionalidade, **Informações Econômicas**, SP, v.34, n.5, 2004.

GALLI, J. A.; MICHELOTTO, M. D.; SILVEIRA, L. C.; MARTINS, A. L. M. Qualidade de mangas cultivadas no Estado de São Paulo, **Bragantia**, v. 67, n. 3, 2008.

GATE, L.; PAUL, J.; BAG, N.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomed Pharmacother**, v.53, n.4, p.169-80, 1999.

GHAYOUR-MOBARHAN, M.; NEW, S. A.; LAMB, D. J.; STARKEY, B.J.; LIVINGSTONE, C.; WANG, T.; VAIDYA, A.; FERNS, G.A. Dietary antioxidants and fat are associated with plasma antibody titers to heat shock proteins 60, 65, and 70 in subjects with dyslipidemia. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 81, n. 5, p. 998-1004, 2005.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. M. **Free Radic. Biol. Med.**. 3th ed. Oxford University Press, 1999.

HERBERT, V.; SHAW, S.; JAYATILLEKE, E. Vitamin C-driven radical generation from iron. **J. Nutr.**, v.126, p.1.213 – 20, 1996.

HEYDARI, A. R.; WU, B.; TAKAHASHI, R.; STRONG, R.; RICHARDSON, A. Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. **Mol. Cel. Biol.**, v.13, n.5, p. 2.909 -18, 1993.

HONARBAKHS, S., SCHACHTER, M. Vitamins and cardiovascular disease. **Braz. J. Nutr.**, v.101, n.8, p. 1.113-31, 2009.

JEAUROUND, E.; SCHUMANN, B.; CLUNIES, M. Supplementation of diets with herbal extracts enhances growth performance in newly-weaned piglets. **J. Anim. Sci.**, v.80, p.394, 2002.

KELLY, D. A.; TIIDUS, P. M.; HOUSTON, M. E.; NOBLE, E. G. Effect of vitamin E deprivation and exercise training on induction of HSP70. **J. Appl. Physiol.**, v.81, p.2379–85, 1996.

KUSKOSKI, M. E.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; FILHO, J. M.; FETT, R. Determination de la capacidad antioxidante de pulpa de frutos,. **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, v.25, n.4, out-dez, p.726-732, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly fo the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680- 685, 1970.

LEE, K. W.; LEE, H. J.; SURH, Y. J.; LEE, C. Y. Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.78, n.6, p.1074-8, 2003

LIMA, M. R. **Avaliação de resíduos de frutas nas rações de tilápia do Nilo.** Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010, Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (área de concentração: Nutrição de Não-Ruminantes) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real – time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)}. **Method. Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LOCKE, M.; NOBLE, E. G.; ATKINSON, B. G. Exercising mammals synthesize stress proteins. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. C723-C729, 1990.

MARKLUND, S. In: **Handbook of methods for oxygen radical research**. Boca Raton. CRC Press, p.243-247, 1985.

MARTIM, N. S. P. P., **Estudo das características de processamento da manga (Mangifera indica L.) variedade Tommy Atkins desidratada**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2006, Dissertação (Mestrado), Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 62, p. 670-684, 2005.

MACNEILL, R. E.; MILLER, N.; KERIN, M. J., Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. **BMC Mol. Biol.**, v.8, n.107, p.1-13, 2007.

MCNULTY, H.; JACOB, R. F.; MASON, R. P. Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. **Am. J. Cardiol.** v.10, p.120-9, 2008.

MONCORVO, M. C. R., SILVA, C. F., SANTOS, S. T. A., EL-WARRAK, A. O., SEBALHOS, S. Tratamento homeopático da hepatotoxicose aguda induzida por tetracloreto de carbono em coelhos. **Cien Rural** v.28, p. 405-9, 1998.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações**. 4 ed. São Paulo: Robe, 2003.

MORIMOTO, R. I. Cells in stress: transcriptional activation of heat-shock genes. **Science (Wash. DC)**. v. 259, p.1409-10, 1993.

NELSON, D. L., COX, M. M., **Lehninger Principles of Biochemistry**, 4ª edição, W. H. Freeman, 2005.

NETO, J. M. F. A.; SILVA, L. P.; MACEDO, D. V. Proteínas de estresse “hsp70” atuam como marcadoras de estresse oxidativo em ratos “wistar” submetidos a treinamento intermitente de corrida para indução de overreaching, **Braz. J. Biomotricity**, Agosto- 2008.

NWOSE, E.U; JELINEK, H.F.; RICHARDS, R.S, KERR, P.G. The vitamin E regeneration system (VERS) and an algorithm to justify antioxidant supplementation in diabetes – A hypothesis. **Medic. Hypoth.**, v.70, n.5, p.1002-8, 2008.

NUNES, N. S. I., **O efeito de diferentes fontes de licopeno sobre o estresse oxidativo**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

OMOREGIE, E. Utilization and nutrient digestibility of mango seeds and palm kernel meal by juvenile *Labeo senegalensis* (Antheriniformes: ciprinidae). **Aquacult. Res.**, v. 32, p. 681-7, 2001.

PAIDAS, C. N.; MOONEY, M. L.; THEODORAKIS, N. G.; MAIO A. DE, Accelerated recovery after endotoxic challenge in heat shock-pretreated mice. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physio.**, v. 282, p.1374-1381, 2002.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Dietary antioxidants: chemical and biological importance. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. J. Braz. Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 34, n. 3, p. 231-247, dez. 2009.

PUNITHAVATHI, V. R.; PRINCE, P. S. Pretreatment with a combination of quercetin and alpha-tocopherol ameliorates adenosine triphosphatases and

lysosomal enzymes in myocardial infarcted rats. **Life Sci**, v. 86, n. 5-6, p. 178-84, 2010.

RATNAM, D.; ANKOLA, D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.; KUMAR, M. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **J. Control Release**, v. 113, n. 2, p. 189-207, 2006.

RADONIĆ, A.; THULKE, S.; MACKAY I. M.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.4, p.856-862, 2004.

RAO, A.V.; RAO, L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacol Res**. v.55, n.3, p. 207-16, 2007.

REEVES, P. G., NIELSEN, F. H., FAHEY, G. C. JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.** v.123, n.11, p.1939-51, 1993.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZIO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 21, n.3, p. 133-149, Sept./Dec., 2005.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ J. H.; QUEIROZ, M. E. L. R.; CAMPOS, F. M.; SANT'ANA, H.M.P. Antioxidant in Mango (*Mangifera indica* L.) Pulp. **Plant Foods Hum Nutr.**, v. 62, p.13-17, 2007.

RIBEIRO, S. M. R.; BARBOSA, L. C. A.; QUEIROZ, J. H.; KNÖDLER, M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chem.**, v.110, p.620-626, 2008.

RODRIGUEZ, S. H. S.; ALVARADO, E. D. R.; VÁSQUEZ, G. E. B., FÉLIX, C. S. C. El efecto estresante del tabaco, alcohol, sobrepeso y exceso de ejercicio

físico, es manifestado a través de la expresión de la hsp70, **Arch. . Med.**, v.2, n. 4, 2006.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n.1, p. 53-60, 2007.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: VIGO-PELFREY, C. (Ed): **Membrane lipid oxidation**. 1th ed. Boca Raton: *CRC Press*, p.151-170, 1991.

SNOECKX, L., H., E., H., CORNELUSSEN, R., N., VAN NIEUWENHOVEN, F., A., RENEMAN, R., S., VAN DER VUSSE, G., J. Heat Shock Proteins and Cardiovascular Pathophysiology, **Physiol Rev**, v. 81, 2001.

SEUNG-CHEOL, J. I., JEONG, G. S.; GWANG, I. M. Dietary medicinal herbs improve growth performance, fatty acid utilization and stress recovery of Japanese flounder. **Fisheries Sci.** v.73; p.70-76, 2007.

STIPANUK, M. H. **Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 1007, 2000.

TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. **Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação (NEPA), UNICAMP**. v.2. 2.ed. Campinas, 2006.

TENNANT, B. C. Hepatic function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clin. Biochem. Dom. Anim.**, 5th ed. London: Academic Press, p.327-352, 1997.

THABREW, M. I.; SAMARAWICKREMA, N.; CHANDRASENA, L. G.; JAYASEKERA, S. Effect of oral supplementation with vitamin E on the oxidoreductive status of red blood cells in normal mice and mice subject to oxidative stress by chronic administration of Adriamycin. **Ann Clin Biochem.** v. 36, p. 216-20, 1999.

THEODORAKIS, N. G.; BANERJI, S. S.; MORIMOTO, R. I. Hsp70 RNA messenger translations in chicken reticulocytes is regulated at the level of elongation. **J. Biol. Chem.**, v.263, n.28, p.14579-85, 1988.

TOGNI, V. G. **Efeito da Salinidade Sobre a Resposta do Sistema Antioxidante e Expressão de HSP70 em Siris (gênero *Callinectes*)**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007. 75p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (Área de Concentração em Fisiologia) da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

TURRENS, J.F.; BOVERIS, A. Geration of superoxide anion bh NADH dehidrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem J.**, London, v. 191, n. 2, p. 421 – 427, Nov. 1980.

VANELLA, A.; CAMPISI, A.; GIACOMO, C.; SORRENTI, V.; VANELLA. G. ACQUAVIVA, R. Enhanced Resistance of Adriamycin-Treated MCR-5 Lung Fibroblasts by Increased Intracellular Glutathione Peroxidase and Extracellular Antioxidants. **Biochem Mol Med.**, v. 62, p. 36-41, 1997.

VAN WHY, S. K., MANN, A. S., THULIN, G., ZHU, X. H., KASHGARIAN, M., SIEGEL, N. J. Activation of Heat-Shock Transcription Factor by Graded Reductions in Renal ATP, In Vivo, in the Rat. **Am Soc Clinl Invest.**, v. 94, p. 1518-1523, 1994.

VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. de F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres, **Rev. Eletr. de Farm**, UNESP, v. IV, n.2, p.119-130, 2007.

WANG, S.; EDENS, F. W. Stress-induced heat shock protein synthesis in peripheral leukocytes of turkeys, *Meleagris gallopavo*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.106b, n. 3, p. 621-628. 1993.

WHITE, C. W. Expression of manganese superoxide dismutase is not altered in transgenic mice with elevated level of copper-zinc superoxide dismutase. **Free Radic. Biol. Med.**, v.15, p.629-636, 1993.

WAGNER, H. R. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v.17, p.249-258, 1994.

ANEXOS

Anexo 1: Equivalência da concentração de polpa de manga na dieta experimental dos animais com a dieta humana.

- Unidade de manga Ubá média = 110,0 gramas
 - Polpa: 70,0 gramas (64,0%).
 - Teor de umidade: 84%
- Dieta humana de 2800 Kcal (3,76 Kcal/g)
- ✓ 3% de manga:
19,95 g de manga liofilizada = 124,67 g de polpa úmida ~ 2 mangas Ubá média.
- ✓ 10% de manga:
74,47 g de manga liofilizada = 468,44 g de polpa úmida ~ 7 mangas Ubá média.

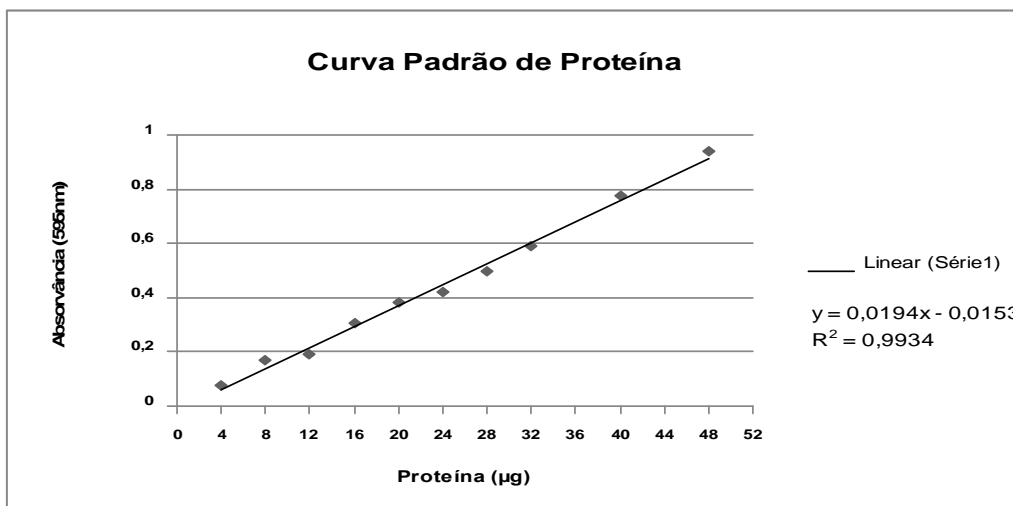


Figura 1: Curva padrão de proteína, utilizando albumina sérica bovina, segundo o método de Bradford.

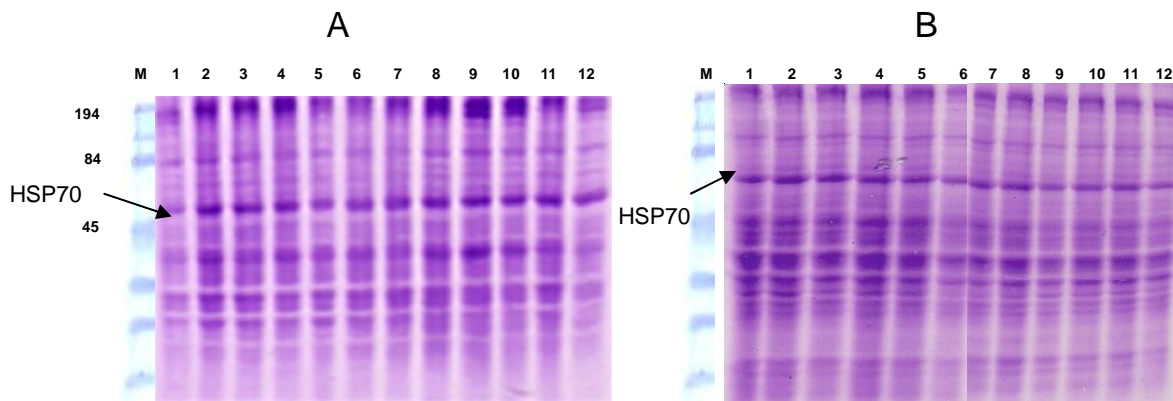


Figura 2: Gel de proteína do fígado dos animais no experimento de 24 horas: (A: controle e manga 3% e B: manga 10%, vitamina E).

Na figura A os nº de 1 a 6 representam o subgrupo manga 3% e os de 7 a 12 o subgrupo controle. Em B os nº de 1 a 6 representam o subgrupo manga 10% e de 7 a 12 o subgrupo vitamina E, sendo portanto todos os subgrupos compostos por seis animais cada. Nas duas figuras a letra M representa o marcador Prestained SDS Page Broad Range (Bio-Rad), sendo os valores ao lado as massas moleculares das proteínas.

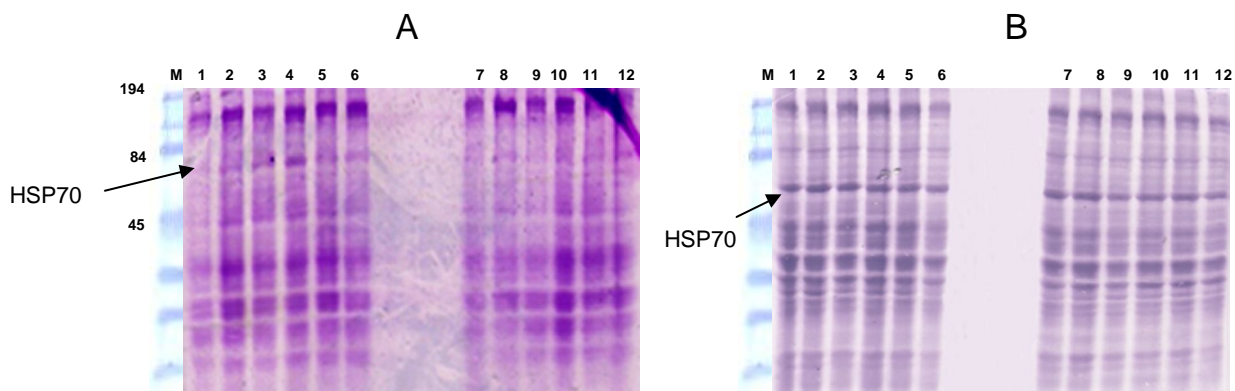


Figura 3: Gel de proteína do fígado dos animais no experimento de 25 dias: (A: controle e manga 3% e B: manga 10% e vitamina E).

Na figura A os nº de 1 a 6 representam o subgrupo manga 3% e os de 7 a 12 o subgrupo controle. Em B os nº de 1 a 6 representam o subgrupo manga 10% e de 7 a 12 o subgrupo vitamina E, sendo portanto todos os subgrupos compostos por seis animais cada. Nas duas figuras a letra M representa o marcador Prestained SDS Page Broad Range (Bio-Rad), sendo os valores ao lado as massas moleculares das proteínas.

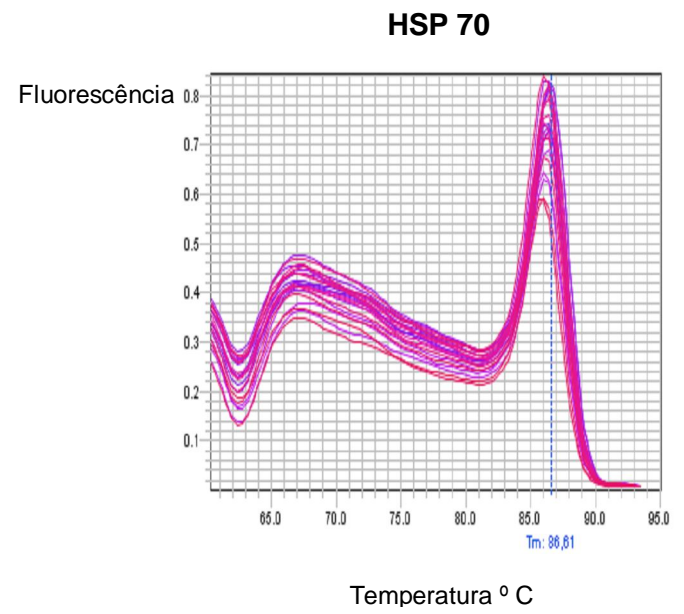
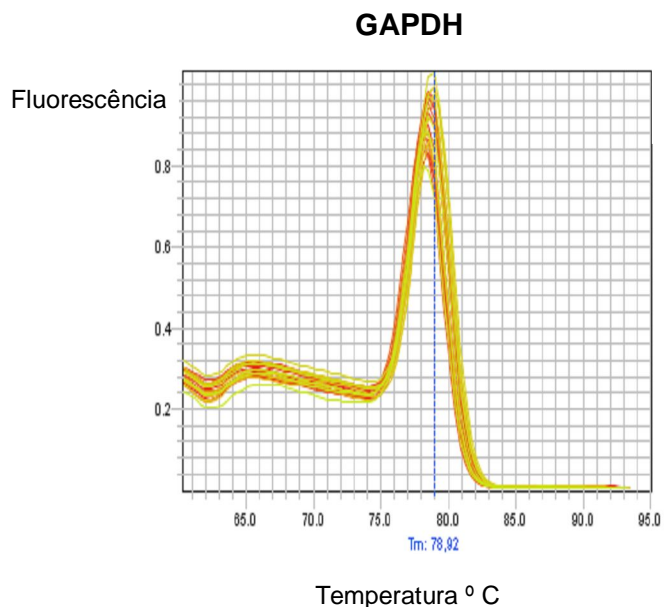


Figura 4: Curvas de *melting* para os genes avaliados por RT-PCR em tempo real.