

KIRIAQUE BARRA FERREIRA BARBOSA

**BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO E DETERMINANTES DA
SÍNDROME METABÓLICA EM ADULTOS JOVENS SAUDÁVEIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

KIRIAQUE BARRA FERREIRA BARBOSA

**BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO E DETERMINANTES DA
SÍNDROME METABÓLICA EM ADULTOS JOVENS SAUDÁVEIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2010.

Sônia Machado Rocha Ribeiro
(Coorientadora)

Antônio Policarpo Souza Carneiro
(Coorientador)

Profa. Neuza Maria Brunoro Costa

Prof. Leandro Licursi de Oliveira

Profa. Josefina Bressan
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A elaboração de uma tese de doutorado é um produto coletivo embora sua redação, responsabilidade e estresse seja predominantemente individual. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo. A todas elas registro minha imensa gratidão!

À energia suprema, criadora do universo, pelo dom da vida, por estar aqui mesmo que de passagem e poder encher de ar os pulmões.

À minha família, sobretudo à minha mãe, por ter proporcionado minha formação.

Aos voluntários do estudo pela valorosa colaboração, assiduidade e comprometimento. Sem eles nada disso seria possível.

Ao povo brasileiro por ter custeado meus estudos, desde os primeiros anos.

À Universidade Federal de Viçosa, pelo ensino público e de qualidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão do financiamento que possibilitou a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

À professora Josefina Bressan, pela orientação, oportunidade e confiança depositada e, sobretudo pelo exemplo de intensa dedicação e competência, minha imensa gratidão e admiração.

Aos professores Sérgio Oliveira de Paula e Leandro Licursi, meus sinceros agradecimentos, pela atenção e disponibilidade em ajudar.

Ao professor Murilo Zerbini pelo suporte técnico, e à Dandan, facilitadora do processo.

Ao professor Antônio Policarpo Souza Carneiro significativo auxílio estatístico.

À Professora Sônia Machado Rocha Ribeiro, meus irrestritos agradecimentos pela sua pronta disponibilidade. Suas reflexões críticas e criativas sobre o objeto de estudo, creio que auxiliaram a dar norte a este trabalho.

À Professora Neuza Maria Brunoro Costa, por ter me desvendado a espectrofotometria de absorção atômica.

Aos professores José Alfredo Martínez Hernández e María Angeles Zulet pela orientação do treinamento realizado na Universidad de Navarra, Espanha, como parte da cooperação internacional Brasil-Espanha CAPES/MEC/DGU

À Ana Carolina Pinheiro Volp, parceira de trabalho, com que compartilhei os entraves, percalços e também as glórias desse projeto.

À Damiana e à Ana Cristina, que não me negaram um espaço nas suas agendas, pela solicitude em ajudar.

À Carol, estagiária cujo auxílio foi imprecindível para a realização do estudo

À Luana Celina, última figurinha do álbum, pelo companherismo irrestrito.

Aos amigos, pelo especial talento em tornar a vida mais colorida.

Aos colegas do LAMECC, pela troca de experiências e agradável convívio.

Enfim...,

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Referências bibliográficas.....	5
2. CAPÍTULO 1: Concentrações plasmáticas de lipoproteína de baixa densidade oxidada e determinantes da síndrome metabólica em adultos jovens saudáveis.....	8
2.1. Introdução.....	8
2.2. Voluntários e métodos.....	9
2.2.1. Voluntários.....	9
2.2.2. Parâmetros antropométricos e de composição corporal	10
2.2.3. Pressão arterial	10
2.2.4. Análise de amostras biológicas	11
2.2.5. Consumo alimentar e variáveis de estilo de vida	13
2.2.6. Análise estatística	13
2.3. Resultados.....	14
2.4. Discussão.....	19
2.5. Referências bibliográficas.....	27
3. CAPÍTULO 2: Ingestão calórica diminuída melhora a capacidade antioxidante total do plasma	33
3.1. Introdução	33
3.2. Voluntários e métodos	34
3.2.1. Voluntários	34
3.2.2. Parâmetros antropométricos e de composição corporal	35
3.2.3. Pressão arterial	36
3.2.4. Análise de amostras biológicas	36
3.2.5. Consumo alimentar e variáveis de estilo de vida	38
3.2.6. Análise estatística	39
3.3. Resultados	39

3.4. Discussão	44
3.5. Referências bibliográficas	50
4. CAPÍTULO 3: Preditores da atividade eritrocitária de glutathiona peroxidase em adultos jovens saudáveis.....	57
4.1. Introdução.....	57
4.2. Voluntários e métodos.....	58
4.2.1. Voluntários.....	58
4.2.2. Parâmetros antropométricos e de composição corporal	59
4.2.3. Pressão arterial	60
4.2.4. Análise de amostras biológicas	60
4.2.5. Consumo alimentar e variáveis de estilo de vida	62
4.2.6. Análise estatística	62
4.3. Resultados	63
4.4. Discussão	68
4.5. Referências bibliográficas	74
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
APÊNDICES.....	81

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1: Parâmetros antropométricos, clínicos e bioquímicos (média ± DP) categorizados pelo valor da mediana (69,36 U/L) da concentração plasmática da LDLox.....	16
Tabela 1.2: Variáveis de estilo de vida e ingestão dietética diária (média ± DP) categorizadas pelo valor da mediana (69,36 U/L para variáveis de estilo de vida e 68,56 U/L para ingestão dietética diária) da concentração plasmática da LDLox.....	17
Tabela 1.3: Preditores da concentração plasmática da LDLox (U/L): regressão linear simples (n=160).....	18
Tabela 1.4: Análise de Regressão Logística: razão de chances (OR) e IC 95% para os componentes da síndrome metabólica de acordo com as concentrações plasmáticas da LDLox (n=160).....	18

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1: Parâmetros antropométricos, clínicos e bioquímicos (média ± DP) categorizados pelo valor da mediana (1,60 mM) da CAT.....	41
Tabela 2.2: Variáveis de estilo de vida e ingestão dietética diária (média ± DP) categorizadas pelo valor da mediana (1,60 mM para variáveis de estilo de vida e 1,62 mM para ingestão dietética diária) da CAT.....	42
Tabela 2.3: Associação (coeficiente de correlação de <i>Spearman</i> : r) entre a CAT (mM) e os parâmetros antropométricos, clínicos, bioquímicos e ingestão dietética diária.....	43
Tabela 2.4: Preditores da CAT (mM): regressão linear simples (n=156).....	44

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1: Parâmetros antropométricos, clínicos e bioquímicos (média ± DP) categorizados pelo valor da mediana (522,63 nmol/[ml/min]) da atividade eritrocitária da GPx.....	65
Tabela 3.2: Variáveis de estilo de vida e ingestão dietética diária (média ± DP) categorizadas pelo valor da mediana (522,63 nmol/[ml/min]) da atividade eritrocitária da GPx.....	66

Tabela 3.3: Associação (coeficiente de correlação de <i>Spearman</i> : r) entre a atividade eritrocitária da GPx (nmol/[ml/min]) e os parâmetros antropométricos, clínicos, bioquímicos e ingestão dietética diária.....	67
Tabela 3.4: Preditores da atividade eritrocitária da GPx (nmol/[ml/min]): regressão linear simples (n=101).....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]
ABTS ⁺⁺	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate] oxidado
ADMA	Asymmetric dimethylarginine
ATP	Adenosine trifosfato
Apo B 100	Apolipoproteína B 100 da LDLox
CA _t	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Ferric reducing ability of plasma
g	Força gravitacional
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR	Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina
IMC	Índice de massa corporal
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDL _{pd}	Partículas pequenas e densas da lipoproteína de baixa densidade
mAb-4E6	Anticorpo monoclonal contra LDLox
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MDA	Malondialdeído
MET	Índice metabólico equivalente
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NCEP-ATPIII	Third report of the national cholesterol education program (NCEP) - expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III)

OH [•]	Radical hidroxila
OR	Odds ratio, Razão de chances
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
P	Nível de probabilidade
PTP's	Proteína-tirosina fosfatase
r	Coefficiente de correlação de Spearman
r ²	Coefficiente de determinação da regressão linear simples
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SOD	Superóxido dismutase
SOD-Cu/Zn	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
SOD-Mn	Superóxido dismutase dependente de manganês
TBARS	Thiobarbituric reactive acid substances
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TMB	3, 3', 5, 5' - tetrametilbenzidina
TRAP	Total peroxy radical trapping potential
TROLOX	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
WHO	World health organization, Organização mundial de saúde
β	Coefficiente da regressão linear simples
8-iso-PGF _{2α}	8-isoprostaglandin F _{2α}
8-OHdG	8-Hidroxyl-2' - deoxyguanosine
95% IC	Intervalo de confiança de 95%

RESUMO

BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Biomarcadores do estresse oxidativo e determinantes da síndrome metabólica em adultos jovens saudáveis.** Orientadora: Josefina Bressan. Co-orientadores: Valéria Paula Rodrigues Minim, Rita de Cássia Gonçalves Alfenas, Sônia Machado Rocha Ribeiro e Antônio Policarpo Souza Carneiro.

Os biomarcadores oxidativos desempenham importante papel na gênese de processos relacionados à síndrome metabólica. O estudo se propôs a investigar, em indivíduos jovens e saudáveis, os biomarcadores do estresse oxidativo: concentrações plasmáticas de lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox), capacidade antioxidante total do plasma (CAT) e atividade eritrocitária da glutatona peroxidase (GPx) e suas possíveis associações com os parâmetros antropométricos, de composição corporal, clínicos, bioquímicos e dietéticos, relacionados à síndrome metabólica. O presente estudo avaliou 160 indivíduos jovens e saudáveis, com idade entre 18 e 35 anos. Os parâmetros antropométricos e de composição corporal foram aferidos mediante técnicas previamente padronizadas e descritas na literatura. Utilizou-se esfigmomanômetro mecânico de coluna de mercúrio para a aferição da pressão arterial. Após jejum de 12 horas, mediante punção venosa, foram coletadas amostras de sangue para proceder às análises dos parâmetros bioquímicos e biomarcadores do estresse oxidativo. As amostras (soro, plasma e eritrócitos) foram acondicionadas a -80°C até o momento do ensaio. As concentrações séricas de glicose, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-c), triacilgliceróis, ácido úrico e ceruloplasmina foram analisadas por ensaios colorimétricos ou turbidimétricos. As concentrações plasmáticas de insulina e LDLox foram analisadas por ensaio imunoenzimático (ELISA), a CAT do plasma por ensaio colorimétrico e a atividade eritrocitária da GPx por ensaio de cinética enzimática. As concentrações de selênio, cobre e zinco foram aferidas em amostras de unhas, mediante espectrofotometria de absorção atômica. A ingestão dietética diária foi avaliada mediante aplicação de registro alimentar de 72 horas, referente a três dias não consecutivos. As comparações entre grupos, categorizados pela mediana da distribuição dos biomarcadores do estresse oxidativo, foram feitas mediante os testes de *Mann-Whitney-U* ou *Student-t*, de acordo com a distribuição das variáveis. Foi utilizada a correlação de *Spearman* para rastrear a associação entre os biomarcadores do estresse oxidativo e as demais variáveis estudadas. Modelos de regressão linear foram utilizados para identificar os fatores preditivos dos biomarcadores oxidativos. A análise de regressão logística foi realizada para a associação dos

componentes da síndrome metabólica com as concentrações plasmáticas da LDLox. Os resultados foram apresentados como média \pm DP. O intervalo de confiança de 95% foi utilizado para descrever os valores do coeficiente de regressão linear (β) e o de regressão logística, odds ratio (OR). Foi considerado o nível de significância estatística de $P < 0,05$. Em indivíduos saudáveis e normolipidêmicos, as frações lipídicas (CT, LDL-c e CT/HDL-c), os níveis séricos de ácido úrico e a atividade eritrocitária da GPx tiveram efeitos preditivos positivos sobre as concentrações da LDLox. O melhor estado nutricional de selênio, marcado pela concentração deste mineral nas unhas, esteve associado à diminuição da concentração plasmática da LDLox. Os indivíduos que se posicionaram no maior quartil ($\geq 91,81$ U/L) da distribuição dos níveis circulantes da LDLox, quando comparados àqueles no menor quartil ($< 52,62$ U/L), demonstraram aumento de 240% (OR = 3,40; IC 95% = 1,15 a 9,96; $P = 0,03$) nas chances de apresentar concentrações séricas aumentadas de triacilgliceróis. Indivíduos com maiores níveis circulantes de LDLox ($> 69,36$ U/L) demonstraram maiores valores de índice de massa corporal. O percentual de gordura troncular ($r = 0,16$; $P = 0,043$), a ingestão dietética diária de colesterol ($r = 0,17$; $P = 0,045$), a concentração sérica de triacilgliceróis ($r = 0,13$; $P = 0,013$), os níveis de pressão arterial sistólica ($r = 0,17$; $P = 0,027$) e a concentração de cobre nas unhas ($r = -0,17$; $P = 0,046$) se correlacionaram significativamente às concentrações da LDLox. O nível de ingestão calórica foi o primeiro fator a atuar na modulação da CAT do plasma, antes mesmo de se estabelecer desvios antropométricos ou metabólicos, sendo a ingestão diária de calorias (kcal/kg de peso) e carboidrato (g/kg de peso), preditores negativos da CAT do plasma. Indivíduos cujos valores da CAT do plasma estavam acima da mediana ($> 1,60$ mM) demonstraram maiores níveis séricos de LDL-c, maior relação colesterol total/fração HDL-c e maior concentração de selênio nas unhas. Condições oxidantes tais como, a concentração plasmática de LDLox e o % gordura troncular, tiveram efeito preditivo sobre o aumento da atividade eritrocitária da GPx. Indivíduos com maior atividade enzimática da GPx ($> 522,63$ nmol/[ml/min]) demonstraram maiores valores de idade, ingestão diária de vitamina C e por outro lado, menores concentrações dos minerais selênio e cobre nas unhas. A dosagem de selênio nas unhas, apesar de ser uma alternativa interessante para a avaliação do estado nutricional deste mineral, não foi capaz de refletir o aumento da atividade eritrocitária da GPx. Mesmo em indivíduos jovens e saudáveis, biomarcadores do estresse oxidativo; concentrações plasmáticas da LDLox, CAT do plasma e atividade eritrocitária GPx, já se mostraram associados a determinantes da síndrome metabólica.

ABSTRACT

BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira Barbosa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Oxidative stress biomarkers and metabolic syndrome in healthy young adults.** Advisor: Josefina Bressan. Co-Advisors: Valéria Paula Rodrigues Minim, Rita de Cássia Gonçalves Alfenas, Sônia Machado Rocha Ribeiro and Antônio Policarpo Souza Carneiro.

Oxidative stress, assessed by its biomarkers, has been suggested as an event directly associated with metabolic syndrome. In this context, it is important to better understanding the mechanisms involved in the etiology of this association. The purpose of this study was to evaluate, in healthy young adults, the potential associations between oxidative biomarkers, oxidized low density lipoprotein (oxLDL), total antioxidant capacity of plasma (TAC), erythrocytes glutathione peroxidase activity (GPx) and several anthropometric, body composition, clinical, biochemical and dietary intake data linked with metabolic syndrome. This study evaluated 160 young healthy individuals, aged between 18 and 35. Anthropometric and body composition measurements were carried out following standardized protocols. Systolic and diastolic blood pressures were measured by a mercury sphygmomanometer. Blood samples were draw by vein puncture after a 12-hour overnight fast. All samples (plasma, serum and erythrocytes) were immediately stored at -80°C until assay. Serum glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), triacylglycerols, uric acid and ceruloplasmin concentrations, were assessed by an automated colorimetric or turbidmetric assay, with specific commercially available kits. Plasma oxLDL and insulin concentrations were measured by an ELISA assay kit as described by the supplier. TAC was measured by a colorimetric assay kit and GPx activity by a kinetic enzymatic assay kit, as described by the supplier. Selenium, copper and zinc nail concentrations were measured by atomic absorption spectrophotometry. A 72-h food record (3 no-consecutive days) was used to collect information about daily caloric and nutrient intake. The Kolmogorov-Smirnov normality test was used to determine variable distribution. Accordingly, the parametric Student t test or nonparametric Mann-Whitney U test was performed to detect differences between groups categorized by the median of oxidative stress biomarkers. The Spearman correlation coefficients were used to screen the statistical associations between oxidative biomarkers and interest variables. Linear regression model was fitted to identify the predictors of oxidative biomarkers. The odds ratio was determined considering the first quartile of oxLDL distribution as reference. Results are presented as mean \pm SD (standard deviation).

Confidence intervals (95% CIs) were used to describe linear regression coefficient (β) and logistic regression odds ratio (OR) values, $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were performed by using SAS system version 8.0 for Windows. Linear regression analysis showed, total cholesterol, triacylglycerol, total cholesterol-to-HDL-c ratio, uric acid and GPx activity were positive predictors of oxLDL circulating levels. OxLDL concentration was negatively predicted by nail selenium concentration. Subjects who are in the highest quartile of circulating oxLDL (≥ 91.81 U/L) had increased chance of 240% (OR = 3.40; IC 95% = 1.15 to 9.96; $P = 0.03$) for present high levels of triacylglycerol when compared with those in the lowest quartile (< 52.62 U/L). Moreover, subjects with high circulating levels of oxLDL (> 69.36 U/L) demonstrated high values of body mass index. In addition, the following statistical correlations with oxLDL concentrations were detected: trunk fat ($r = 0.16$; $P = 0.043$), cholesterol intake ($r = 0.17$; $P = 0.045$), serum triacylglycerol ($r = 0.13$; $P = 0.013$), systolic blood pressure ($r = 0.17$; $P = 0.027$) and nail copper concentrations ($r = -0.17$; $P = 0.046$). Linear regression analysis showed that daily caloric (kcal/kg of body weight) and carbohydrate (g/kg of body weight) intake exerted negative predictive effect on TAC values. In individuals who presented a higher TAC (> 1.60 mM), the serum LDL-c, cholesterol-to-HDL-c ratio and nail selenium concentrations were significantly higher. By linear regression analysis, the GPx activity was positively predicted by oxidative conditions such as trunk fat and circulating levels of oxLDL. Subjects with high GPx activity (> 522.63 nmol/[ml/min]) demonstrated high values of age, daily intake of vitamin C and and moreover, low nail selenium and copper concentrations. Oxidative biomarkers such as oxLDL, TAC of plasma and erythrocytes GPx activity were related with several anthropometric, body composition, clinical, biochemical and dietary intake measurements linked to metabolic syndrome. This findings support a relevant role of these biomarkers as remarkable tools in assessing the impact of oxidative damage on the development of metabolic syndrome.

1. INTRODUÇÃO

Os organismos aeróbicos utilizam o oxigênio como meio de obtenção de energia, de cujo metabolismo resulta os radicais livres e espécies reativas não radicais. Sua produção em proporções adequadas constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes, incluindo a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, a geração de energia na cadeia transportadora de elétrons, a fertilização do óvulo, a expressão gênica e a ativação de mecanismos de defesa imunológica durante a infecção (Halliwell and Whiteman 2004, Hicks, Torres-Ramos et al. 2006).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre condições oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres e/ou espécies reativas não radicais ou em detrimento da velocidade de remoção desses. São geradas inúmeras espécies reativas: os radicais livres (têm um elétron desemparelhado na sua camada eletrônica) e as espécies reativas não radicais (espécies reativas de oxigênio ou de óxido de nitrogênio), favorecendo a ocorrência de danos oxidativos (Halliwell and Whiteman 2004). Em paralelo, são desenvolvidos os mecanismos de defesa antioxidante (Mayne 2003).

Quando a produção de radicais livres e/ou espécies reativas não radicais supera a capacidade de ação do sistema de defesa antioxidante, instala-se o estresse oxidativo, o que favorece a oxidação de biomoléculas, gerando metabólitos específicos, os biomarcadores do estresse oxidativo, que podem ser identificados e quantificados. Tais biomarcadores são derivados, sobretudo, da oxidação de lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA) (Mayne 2003; Halliwell and Whiteman 2004; Vincent, Innes et al. 2007). Outra forma de abordar a avaliação do estresse oxidativo é pela utilização de métodos indiretos, baseados na capacidade das defesas antioxidantes (Young 2001; Huang, Ou et al. 2005).

Os danos oxidativos ocorrem por meio da oxidação de biomoléculas, com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano potencial contra células e tecidos (Hicks, Torres-Ramos et al. 2006). A cronicidade do processo em questão tem relevantes implicações sobre a etiopatogenia de numerosas enfermidades crônicas não transmissíveis, entre elas a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (Furukawa, Fujita et al. 2004; Galili, Versari et al. 2007; Roberts and Sindhu 2009). Ferrari (2004), em estudo de revisão, ratifica que a geração de radicais livres

desencadeia eventos patológicos que por sua vez, estão envolvidos nos processos aterogênicos, carcinogênicos e neurodegenerativos.

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não radicais. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: bloqueio da formação dos radicais livres ou espécies não radicais (sistemas de prevenção), bloqueio da ação desses (sistemas varredores ou scavengers) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (Clarkson and Thompson 2000).

A defesa antioxidante do organismo humano é constituída pelos sistemas enzimáticos e não enzimáticos. Este último é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou exógena (dieta). Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, sejam capazes de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e/ou espécies não radicais ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos (Halliwell and Whiteman 2004; Hicks, Torres-Ramos et al. 2006).

O sistema antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CA_t) e glutathione peroxidase (GPx), além das tioredoxinas e peroxiredoxinas (Nordberg and Arner 2001). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não radicais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (Ferreira and Matsubara 1997).

As enzimas CA_t e GPx atuam impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, catalizadas pelos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical hidroxila (OH[•]), contra o qual não há sistema enzimático de defesa (Ferreira and Matsubara 1997; Schneider and Oliveira 2004). Este radical (OH[•]) vem sendo indicado como o de maior potencial reativo e de extrema instabilidade. Essas características o tornam o radical livre mais propício ao desenvolvimento de danos oxidativos. Além disso, é o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, tendo como conseqüência a alteração da função biológica das membranas celulares, esse radical é capaz de agir sobre as proteínas, alterando-as em relação à sua estrutura

e/ou função biológica. Seu ataque ao DNA possibilita a ocorrência de mutações (Welch, Davis et al. 2002).

Considerando o potencial oxidante do radical OH^{\bullet} e o fato da não existência de defesa enzimática especializada, é de extrema importância a manutenção do perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes, com o propósito de promover a manutenção da integridade celular. Assim, a GPx merece atenção especial, como marcador do estresse oxidativo, uma vez que sua ação depende da manutenção do ciclo redox da glutatona, por meio do controle da relação entre glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). A ação da GPx na redução do peróxido de hidrogênio à água se dá às custas da conversão da glutatona reduzida em oxidada. A recuperação da GSH ocorre mediante atuação de outra enzima, a glutatona redutase, também integrante do ciclo redox da glutatona (Shan, Aw et al. 1990; Andersen, Nielsen et al. 1997; Ferreira and Matsubara 1997; Schneider and Oliveira 2004). Entre as enzimas antioxidantes, a glutatona peroxidase é a que apresenta maior afinidade (menor Km) pelo peróxido de hidrogênio (Little, Olinescu et al. 1970).

A atividade das enzimas antioxidantes muitas vezes depende da participação de cofatores enzimáticos, especialmente antioxidantes de origem dietética. Tais cofatores podem diferir de acordo com os compartimentos celulares de ação das enzimas. A SOD pode ser encontrada sob duas formas: no citoplasma, com dependência de cobre e zinco (SOD-Cu/Zn), enquanto na mitocôndria, necessita do manganês como cofator (SOD-Mn). A CAT é encontrada, predominantemente, nos peroxissomos, onde são dependentes da ação do ferro. A GPx também existe sob duas formas: dependente e independente de selênio e está presente no citoplasma ou na mitocôndria (Ferreira and Matsubara 1997; Green, Brand et al. 2004).

O sistema antioxidante não-enzimático, por sua vez, inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos polifenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E) e o β -caroteno (vitamina A), são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes. Outros carotenóides sem atividade de vitamina A, como licopeno, luteína e zeaxantina, também possuem atividade antioxidante (Fito, de la Torre et al. 2007; Rodrigo, Guichard et al. 2007; Vincent, Innes et al. 2007). Entre os minerais destacam-se o zinco, cobre, selênio, manganês e ferro, cuja atuação como cofatores de enzimas antioxidantes, lhes confere capacidade antioxidante (Ferreira and Matsubara 1997).

Além dos antioxidantes dietéticos, evidenciam-se os compostos de origem endógena que também integram o sistema antioxidante não enzimático. As macromoléculas como a albumina, a ceruloplasmina e a ferritina se constituem em potentes antioxidantes. Estes dois últimos compostos se constituem em proteínas transportadoras dos metais cobre e ferro, respectivamente. A ligação desses metais aos seus transportadores determina a diminuição das suas quantidades livres, prevenindo a sua atuação como catalisadores da geração de radicais OH^{\bullet} , por meio das reações de *Fenton* e *Haber-Weiss*. Entre outros compostos endógenos que também demonstram capacidade antioxidante, destacam-se a glutatona reduzida (GSH) e o ácido úrico (Wayner, Burton et al. 1987; Halliwell 1997).

A utilização da capacidade antioxidante total do plasma como biomarcador do estresse oxidativo se baseia no pressuposto de que a soma da atividade de todos os compostos antioxidantes (fatores endógenos e dietéticos) tem maior capacidade preditiva e relevância biológica quando comparada à atividade de um único, uma vez que existe uma importante cooperação entre os vários compostos antioxidantes na proteção contra os danos oxidativos (Crews, Alink et al. 2001; Kampa, Nistikaki et al. 2002; Blauz, Pilaszek et al. 2008).

Além dos biomarcadores evidenciados anteriormente, a atividade antioxidante da glutatona peroxidase e a capacidade antioxidante total do plasma, destaca-se ainda a lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox), que pode se constituir em um outro indicador do estresse oxidativo. A geração de espécies reativas de oxigênio induz à oxidação da fração LDL-c gerando a LDLox, cuja captação pelos macrófagos, via receptores *scavengers* favorece o início da formação da placa de ateroma, processo que cursa com a instalação do estresse oxidativo (Young, McFarlane et al. 2003; Sjogren, Basu et al. 2005; Reyes, Sánchez et al. 2006; Galili, Versari et al. 2007; Roberts and Sindhu 2009).

O estresse oxidativo vem sendo, continuamente, associado ao processo etiológico de algumas enfermidades crônicas não transmissíveis, como o diabetes tipo 2 e as doenças cardiovasculares. Essas enfermidades são decorrentes de alterações metabólicas, que compreendem principalmente a resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão arterial, que em conjunto, caracterizam a síndrome metabólica (Roberts and Sindhu 2009).

Os estudos acerca da avaliação do estresse oxidativo vêm adquirindo relevância significativa. Os biomarcadores oxidativos desempenham importante papel na gênese de processos metabólicos que culminam na ocorrência das enfermidades crônicas não

transmissíveis. Essa capacidade os torna importantes instrumentos na elucidação de mecanismos e implicações biológicas do dano oxidativo, com o objetivo de possibilitar o planejamento de ações eficazes no controle e na prevenção desses processos (Mayne 2003; Reyes, Sánchez et al. 2006).

Diante do exposto, os biomarcadores do estresse oxidativo constituem ferramentas úteis na avaliação das possíveis associações existentes entre esse processo e os parâmetros antropométricos, bioquímicos, clínicos e dietéticos. Estes parâmetros se constituem em fatores de risco associados ao desenvolvimento da síndrome metabólica, que em conjunto determinam o aumento do risco de ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis, como o diabetes *mellitus* tipo 2 e as doenças cardiovasculares. No presente estudo investigou-se os níveis circulantes de LDLox, a atividade eritrocitária da GPx e a capacidade antioxidante total do plasma e suas associações com variáveis antropométricas, bioquímicas, clínicas e dietéticas, em indivíduos jovens e saudáveis.

1.1. Referências bibliográficas

- Andersen, H. R., J. B. Nielsen, et al. (1997). "Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes." Clin Chem **43**(4): 562-8.
- Blauz, A., T. Pilaszek, et al. (2008). "Interaction between antioxidants in assays of total antioxidant capacity." Food Chem Toxicol **46**(7): 2365-8.
- Clarkson, P. M. and H. S. Thompson (2000). "Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?" Am J Clin Nutr **72**(2 Suppl): 637S-46S.
- Crews, H., G. Alink, et al. (2001). "A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake." Br J Nutr **86 Suppl 1**: S5-35.
- Ferrari, C. K. (2004). "Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging." Biogerontology **5**(5): 275-89.
- Ferreira, A. L. and L. S. Matsubara (1997). "[Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]." Rev Assoc Med Bras **43**(1): 61-8.
- Fito, M., R. de la Torre, et al. (2007). "Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review." Ann Ist Super Sanita **43**(4): 375-81.
- Furukawa, S., T. Fujita, et al. (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." J Clin Invest **114**(12): 1752-61.

- Galili, O., D. Versari, et al. (2007). "Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(2): H904-111.
- Green, K., M. D. Brand, et al. (2004). "Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes." Diabetes **53 Suppl 1**: S110-8.
- Halliwell, B. (1997). "Antioxidants and human disease: a general introduction." Nutr Rev **55**(1 Pt 2): S44-9; discussion S49-52.
- Halliwell, B. and M. Whiteman (2004). "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?" Br J Pharmacol **142**(2): 231-55.
- Hicks, J. J., Y. D. Torres-Ramos, et al. (2006). "Estrés oxidante, concepto y clasificación." Rev Endocrinol Nutr **14**(4): 223-226.
- Huang, D., B. Ou, et al. (2005). "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays." J. Agric. Food Chem. **53**(6): 1841-56
- Inoue, N., S. Kawashima, et al. (1998). "Stretch force on vascular smooth muscle cells enhances oxidation of LDL via superoxide production." Am J Physiol **274**(6 Pt 2): H1928-32.
- Kampa, M., A. Nistikaki, et al. (2002). "A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay." BMC Clin Pathol **2**(1): 3.
- Little, C., R. Olinescu, et al. (1970). "Properties and regulation of glutathione peroxidase." J Biol Chem **245**(14): 3632-6.
- Mayne, S. T. (2003). "Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research." J Nutr **133 Suppl 3**: 933S-940S.
- Nordberg, J. and E. S. Arner (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." Free Radic Biol Med **31**(11): 1287-312.
- Reyes, G. C., I. R. Sánchez, et al. (2006). "Disfunción endotelial y estrés oxidativo." Rev Endocrinol Nutr **14**(4): 233-236.
- Roberts, C. K. and K. K. Sindhu (2009). "Oxidative stress and metabolic syndrome." Life Sci **84**(21-22): 705-12.
- Rodrigo, R., C. Guichard, et al. (2007). "Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins." Fundam Clin Pharmacol **21**(2): 111-27.

- Schneider, C. D. and A. R. Oliveira (2004). "Radicales libres de oxígeno y ejercicio: mecanismos de formación y adaptación al entrenamiento." Rev Bras Med Esporte **10**(4): 308-313.
- Shan, X. Q., T. Y. Aw, et al. (1990). "Glutathione-dependent protection against oxidative injury." Pharmacol Ther **47**(1): 61-71.
- Sjogren, P., S. Basu, et al. (2005). "Measures of oxidized low-density lipoprotein and oxidative stress are not related and not elevated in otherwise healthy men with the metabolic syndrome." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(12): 2580-6.
- Vincent, H. K., K. E. Innes, et al. (2007). "Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity." Diabetes Obes Metab **9**(6): 813-39.
- Wayner, D. D., G. W. Burton, et al. (1987). "The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma." Biochim Biophys Acta **924**(3): 408-19.
- Welch, K. D., T. Z. Davis, et al. (2002). "Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules." Free Radic Biol Med **32**(7): 577-83.
- Young, I. S. (2001). "Measurement of total antioxidant capacity." J Clin Pathol **54**(5): 339.
- Young, I. S., C. McFarlane, et al. (2003). "Oxidative modification of triacylglycerol-rich lipoproteins." Biochem Soc Trans **31**(Pt 5): 1062-5.

2. CAPÍTULO 1

Concentrações plasmáticas de lipoproteína de baixa densidade oxidada e determinantes da síndrome metabólica em adultos jovens saudáveis

2.1. Introdução

Espécies reativas de oxigênio, geradas mediante condições pró-oxidantes, induzem à oxidação de partículas de lipoproteína de baixa densidade (Young, McFarlane et al. 2003). Este processo determina alterações na estrutura dessas partículas, o que compromete sua afinidade pelos seus receptores específicos (Tsimikas 2006). A LDL oxidada (LDLox) passa então a ser reconhecida e captada pelos receptores *scavenger* dos macrófagos. Tal captação desencadeia uma série de processos que culminam na formação de lesões ateroscleróticas, cuja progressão determina a ocorrência de doenças cardiovasculares (Young, McFarlane et al. 2003). Em função do seu relevante papel na etiologia do processo aterogênico, a LDLox vem sendo apontada como um importante marcador de risco cardiovascular (Holvoet, Mertens et al. 2001; Tsimikas 2006). Dados epidemiológicos apontam a síndrome metabólica como fator determinante na ocorrência de eventos cardiovasculares (Isomaa, Almgren et al. 2001; Reindel, Zander et al. 2004; Obunai, Jani et al. 2007).

Diversos estudos têm demonstrado a existência de associações entre o aumento dos níveis circulantes de LDLox e parâmetros antropométricos e bioquímicos, relacionados ao desenvolvimento da síndrome metabólica. Weinbrenner, Schroder et al. (2006) relataram que as concentrações plasmáticas de LDLox estiveram positivamente associadas ao aumento da circunferência da cintura em indivíduos saudáveis com idade entre 25 e 74 anos. No mesmo sentido, Sigurdardottir, Fagerberg et al. (2002) demonstraram que, em homens clinicamente saudáveis, os níveis circulantes de LDLox se correlacionaram positivamente ao índice de massa corporal, relação cintura/quadril, níveis séricos de triacilgliceróis, LDL-c, HDL-c e insulina plasmática. Em um estudo transversal, as concentrações plasmáticas de LDLox, em homens também saudáveis, foram positivamente relacionadas ao LDL-c, triacilgliceróis e ácido úrico (Sjogren, Basu et al. 2005). Em mulheres pós-menopáusicas, a LDLox esteve associada a parâmetros bioquímicos como: colesterol total, triacilgliceróis, LDL-c, HDL-c e concentração de glicose de jejum (Lapointe, Couillard et al. 2007; Kassi, Dalamaga et al. 2009)

Diante do exposto, a oxidação das partículas de LDL-c tem sido sugerida como um evento precoce no desenvolvimento da síndrome metabólica. A associação entre estresse oxidativo e síndrome metabólica já está bem estabelecida (Roberts and Sindhu 2009). Entretanto, ainda existem lacunas de conhecimento acerca da associação entre os biomarcadores do estresse oxidativo e os fatores determinantes do risco de ocorrência da síndrome metabólica em indivíduos saudáveis. Acredita-se que o conhecimento dessas associações permitirá o direcionamento de ações capazes de otimizar a homeostase redox, prevenindo a evolução da síndrome metabólica e suas enfermidades decorrentes.

Neste contexto, o presente estudo se propôs a avaliar, em indivíduos jovens e saudáveis, as concentrações plasmáticas de LDLox e suas possíveis associações com fatores de risco para o desenvolvimento da síndrome metabólica, entre eles: parâmetros antropométricos, de composição corporal, clínicos, bioquímicos e dietéticos.

2.2. Voluntários e métodos

2.2.1. Voluntários

O presente estudo avaliou 160 indivíduos jovens e saudáveis, com idade entre 18 e 35 anos (92 mulheres e 68 homens; idade: $23,2 \pm 3,5$ anos [média \pm DP]; índice de massa corporal: $22,0 \pm 2,9$ kg/m² [média \pm DP]).

Para a triagem inicial dos voluntários considerou-se como critérios de exclusão a evidência de qualquer doença relacionada ao estresse oxidativo, inflamação crônica, desequilíbrios hídricos, mudanças na composição corporal ou presença de alterações na absorção e/ou metabolismo de nutrientes. Outros critérios de exclusão se referiram ao uso de medicamentos ou tratamento nutricional que afetasse o balanço energético, consumo alimentar, perfil lipídico, concentrações plasmáticas de insulina e metabolismo da glicose; o início do uso regular de anticoncepcionais nos 2 meses anteriores à participação no presente estudo; adesão à práticas dietéticas para a perda de peso ou peso instável nos últimos 6 meses (perda ou ganho de 10% do peso corporal).

Em conformidade com os princípios da declaração de *Helsinki* e após explicação clara sobre o protocolo do estudo, cada participante assinou o termo de consentimento livre e esclarecido, permitindo sua participação voluntária. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética

em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (Of. ref. N ° 009/2006).

2.2.2. Parâmetros antropométricos e de composição corporal

A estatura foi aferida utilizando-se estadiômetro (*Seca 206 model, Hamburg, Germany*), com extensão máxima de 2 metros, subdividido em milímetros. Para a aferição do peso corporal utilizou-se balança digital eletrônica (*Tanita TBF-300A model, Tokyo, Japan*), com capacidade máxima de 180 quilogramas e aproximação de 100 gramas. O índice de massa corporal foi calculado pela razão entre o peso corporal (quilogramas) e a estatura ao quadrado (metros).

A circunferência da cintura foi medida no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca e a do quadril na maior circunferência horizontal entre a cintura e os joelhos, sem contração glútea (Salas-Salvado, Rubio et al. 2007). Ambas as circunferências foram aferidas utilizando-se fita métrica flexível e inelástica, subdividida em milímetros. Foi calculada a relação entre as circunferências da cintura e quadril.

As pregas cutâneas tricípital, bicipital, subescapular e suprailíaca foram aferidas utilizando-se adipômetro (*Lange caliper, Cambridge Scientific Industries Inc., Cambridge, Maryland, USA*) com aproximação de 1 milímetro, conforme técnica previamente padronizada (Durnin and Womersley 1974). Procedeu-se ao cálculo do percentual de gordura troncular pela razão entre o somatório das pregas cutâneas subescapular e suprailíaca e o somatório das 4 pregas cutâneas (Warnberg, Nova et al. 2006).

O percentual de gordura corporal total foi obtido mediante análise da bioimpedância elétrica horizontal (*Biodynamics 310 model, Washington, USA*), a partir da qual também foram estimados a massa de gordura e livre de gordura corporal em quilogramas.

2.2.3. Pressão arterial

Os níveis de pressão arterial sistólica e diastólica foram aferidos mediante esfigmomanômetro mecânico de coluna de mercúrio (BIC, São Paulo, Brasil), com aproximação de 2 mmHg, conforme técnica descrita anteriormente (Perloff, Grim et al. 1993).

2.2.4. Análise de amostras biológicas

A coleta de sangue foi realizada por punção venosa, após jejum de 12 horas. As amostras de plasma EDTA (*ethylene-diaminetetra-acetic-acid*), plasma heparina e soro foram separadas do sangue toral mediante centrifugação a 2465 g a 5°C por 15 minutos (*Eppendorf AG, 5804R model, Hamburg, Germany*). Os eritrócitos foram obtidos por centrifugação a 1811 g a 5°C por 10 minutos. As amostras foram imediatamente armazenadas a -80°C até o momento das análises.

As concentrações séricas de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-c), triacilgliceróis, ácido úrico e ceruloplasmina (mg/dL), foram analisadas por ensaio colorimétrico ou turbidimétrico, mediante analisador automático (*BS-200, Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co., Nanshan, China*) utilizando-se kits de análise específicos (*BS-200, Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co., Nanshan, China*).

A lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) foi calculada pela equação de Friedwald, previamente estabelecida (Friedewald, Levy et al. 1972) e posteriormente validada (Tremblay, Morrissette et al. 2004). Procedeu-se também ao cálculo da razão colesterol total/HDL-c, conforme preconizado (Castelli 1988).

A concentração plasmática de insulina (sensibilidade de 2 µU/mL) foi analisada por ensaio imuno enzimático, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando-se material e reagentes providos por kit de análise específico (*Linco Research, St. Charles, USA*): placa recoberta com anticorpo de captura anti insulina humana (anticorpo monoclonal de coelho); anticorpo de detecção anti insulina humana (anticorpo monoclonal de coelho biotinizado) e substrato TMB (*3, 3', 5, 5'- tetrametilbenzidina*). Procedeu-se à dosagem em plasma EDTA, o ensaio foi realizado conforme protocolo descrito no kit de análise.

A resistência à insulina foi estimada pelo modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR), previamente estabelecido (Matthews, Hosker et al. 1985).

As concentrações plasmáticas de LDL oxidada (LDLox; sensitivity < 6.56 U/L) foram analisadas por ELISA, utilizando-se material e reagentes providos por kit de análise específico (*Mercodia, Uppsala, Suécia*): placa recoberta com anticorpo de captura anti LDLox humana (anticorpo monoclonal de camundongo, murino específico, mAB-4E6); anticorpo monoclonal de camundongo anti Apo B 100, conjugado à peroxidase, diluído a 1:10 e substrato TMB, contendo peróxido de hidrogênio e cromóforo. Procedeu-se à dosagem em plasma EDTA, com diluição a 1:6561, o ensaio foi realizado conforme protocolo descrito no kit de análise.

A capacidade antioxidante total (CAT) do plasma foi aferida por ensaio colorimétrico, por meio de kit de análise específico (*Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, catalog no. 709001*). O ensaio foi baseado na habilidade de todos os antioxidantes presentes na amostra (plasma) em inibir a oxidação do substrato oxidável ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) a $ABTS^{*+}$ pela metimioglobina. A quantidade de substrato oxidado ($ABTS^{*+}$) foi monitorada por leitura de absorvância a 750 nm. O decaimento da absorvância a 750 nm foi diretamente proporcional à concentração de antioxidantes no plasma, expressa em mM de trolox equivalente, antioxidante sintético, hidrossolúvel, análogo a vitamina E.

A atividade eritrocitária da glutatona peroxidase (GPx) foi aferida por ensaio de cinética enzimática, mediante kit de análise específico (*Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, catalog no. 703102*). O ensaio se baseou na ocorrência de duas reações acopladas. A primeira catalisada pela GPx, referente à redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água, às custas da conversão da glutatona reduzida (GSH) em glutatona oxidada (GSSH). A GSSH refere-se ao substrato para da segunda reação, catalizada por outra enzima, a glutatona redutase, que recupera a GSH às custas da oxidação do NADPH a $NADP^+$. A oxidação do NADPH foi acompanhada por decaimento da absorvância a 340 nm, diretamente proporcional a atividade eritrocitária da GPx, expressa em nmol/mL/minuto, referente a quantidade de GPx capaz de oxidar 1 nmol de NADPH por mL de amostra por minuto.

Foram coletadas as amostras de unhas dos pés e das mãos, mediante limpeza prévia com água e sabão e retirada de esmalte e, em seguida, armazenadas a temperatura ambiente, em sacos de polipropileno. O preparo das amostras incluía seu tratamento ácido sob aquecimento (ácido nítrico fervente), sob altas pressões, em recipiente de teflon (digestor), usando um sistema de digestão de microondas (*Ethos Plus, Millestone, Sorisole, Italy*). Após a digestão ácida, as concentrações de cobre, zinco e selênio foram analisadas por espectrofotometria de absorção atômica de chama (*Perkin Elmer AAnalyst 800; Norwalk, CT, USA*), conforme técnica estabelecida anteriormente (Navarro-Blasco and Alvarez-Galindo 2004). Os valores de concentração foram ajustados para o peso da amostra, e foram expressas em micrograma por grama de unha ($\mu\text{g/g}$ de unha) para o cobre e o zinco e em nanograma por grama de unha (ng/grama de unha) para o selênio.

2.2.5. Consumo alimentar e variáveis de estilo de vida

A ingestão dietética diária (calorias, carboidrato, proteína, lipídio, fibra, colesterol, ácidos graxos saturados, mono e poliinsaturados, vitaminas C e A, ferro, cobre e zinco) foi avaliada mediante aplicação de registro alimentar de 72 horas, utilizando-se software específico, *DietPRO*, versão 5.0, AS sistemas (DietPRO 2009). Os voluntários eram orientados a registrar em formulário próprio todos os alimentos e bebidas consumidos, bem como suas quantidades, ao longo de um dia. Esse procedimento foi realizado por três dias não consecutivos, incluindo um dia de final de semana.

Variáveis de estilo de vida tais como: uso de suplementos vitamínicos, tabagismo (fumantes ou não-fumantes), número de cigarros por dia, prática regular de atividade física (sim ou não) e intensidade da atividade física também foram coletados. Para quantificar a intensidade de atividade física, foi utilizado o índice metabólico equivalente (MET). Este índice representa a razão entre a quantidade de energia (kcal) despendida para a realização de uma determinada atividade física e a energia equivalente à situação de repouso. Convencionalmente, considera-se que a situação de repouso refere-se ao MET = 1. As pontuações dos METs foram fornecidas pelo Compêndio de Atividades Físicas (Amorim and Gomes 2003), um esquema de codificação que classifica as atividades físicas de acordo com seu dispêndio energético em relação à situação de repouso (Ainsworth, Haskell et al. 1993; Ainsworth, Haskell et al. 2000). Os METs, para cada atividade específica, foram calculados multiplicando o tempo gasto em cada atividade pela sua pontuação de MET, procedendo-se ao somatório de todas as atividades realizadas ao longo de uma semana, obtendo-se um valor médio, expresso em horas por dia.

2.2.6. Análise estatística

Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. De acordo com a distribuição das variáveis, foi adotado o teste de *Student-t*, paramétrico, ou seu equivalente não paramétrico, o teste de *Mann-Whitney-U*, para a comparação entre os grupos categorizados pela mediada da distribuição da concentração plasmática da LDLox. Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste de qui-quadrado- χ^2 .

Foi utilizada a correlação de *Spearman* para rastrear a associação entre a concentração plasmática de LDLox e as demais variáveis de interesse. Modelos de regressão linear simples foram utilizados para identificar os fatores preditivos da concentração plasmática da LDLox

(variável dependente). Estes modelos foram previamente ajustados para as covariáveis sexo, idade, tabagismo e atividade física, quando estes fatores mostraram efeito significativo.

A análise de regressão logística foi realizada para verificar a associação entre os componentes da síndrome metabólica e os níveis circulantes da LDLox (variável independente), considerando-se, como referência, o primeiro quartil da distribuição deste biomarcador para o cálculo da razão de chances (odds ratio).

Os resultados foram apresentados como média \pm DP. O intervalo de confiança de 95% foi utilizado para descrever os valores do coeficiente de regressão linear (β) e o de regressão logística, odds ratio (OR). Foi considerado o nível de significância estatística de 5 % de probabilidade ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS sistema versão 8.0 para Windows, *SAS Institute Inc., Cary, NC 27513, E.U.A.* (SAS 2001).

2.3. Resultados

Os parâmetros antropométricos, clínicos e bioquímicos (média \pm DP) categorizados pelo valor da mediana das concentrações plasmáticas de LDLox (69,36 U/L) são apresentados na Tabela 1.1. Indivíduos com maiores níveis circulantes de LDLox demonstraram maiores valores de índice de massa corporal, colesterol total, LDL-c, relação colesterol total/fração HDL-c, ácido úrico e atividade da GPx e por outro lado, menor concentração de selênio nas unhas. As medidas de adiposidade, como percentual de gordura troncular, massa de gordura corporal, pregas cutâneas tricípital, bicipital, subescapular e suprailíaca, bem como seu somatório não diferiram entre os grupos referentes às concentrações plasmáticas de LDLox ($\leq 69,36$ U/L *versus* $> 69,36$ U/L). Nenhum outro parâmetro antropométrico ou de composição corporal, com exceção do índice de massa corporal, diferiu em relação às concentrações de LDLox. Da mesma forma, nenhuma diferença foi encontrada para os níveis de pressão arterial, entre as categorias de LDLox.

Na Tabela 1.2, apresentam-se as variáveis de estilo de vida e ingestão dietética diária, também categorizadas pelo valor mediano da concentração plasmática da LDLox (69,36 U/L para as variáveis de estilo de vida e 68,56 U/L para a ingestão dietética diária). Não houve diferença para nenhuma dessas variáveis, em relação às categorias de LDLox.

Para um melhor entendimento das associações existentes entre os níveis circulantes de LDLox e as variáveis de interesse, procedeu-se ao teste de correlação de *Spearman*. No

tocante aos parâmetros antropométricos e de composição corporal, somente o percentual de gordura troncular se correlacionou à concentração plasmática da LDLox ($r = 0,16$; $P = 0,043$). Considerando a ingestão dietética diária, com exceção do colesterol ($r = 0,17$; $P = 0,045$), nenhuma outra variável mostrou-se correlacionada à LDLox. Em relação aos parâmetros bioquímicos e componentes do sistema de defesa antioxidante, as seguintes correlações foram encontradas: colesterol total ($r = 0,23$; $P = 0,003$), LDL-c ($r = 0,22$; $P = 0,004$), triacilgliceróis ($r = 0,13$; $P = 0,013$), relação colesterol total/fração HDL-c ($r = 0,41$; $p < 0,001$), concentração de selênio ($r = -0,19$; $P = 0,026$) e cobre nas unhas ($r = -0,17$; $P = 0,046$) e por fim, atividade da GPx ($r = 0,29$; $P = 0,003$). Os níveis de pressão arterial sistólica também se correlacionaram aos níveis circulantes de LDLox ($r = 0,17$; $P = 0,027$). Nenhuma correlação foi encontrada entre as concentrações de LDLox e as variáveis de estilo de vida, como, números de cigarros/dia ou gasto calórico da atividade física relacionado ao gasto energético de repouso (MET) (dados não apresentados em tabela).

Na Tabela 1.3, mediante análise de regressão simples, após o ajuste para os possíveis fatores de confundimento, como, sexo, idade e tabagismo, observou-se que a pressão arterial sistólica, colesterol total, LDL-c, triacilglicerol, relação colesterol total/HDL-c, ácido úrico e atividade de GPx tiveram efeito preditivo positivo sobre os níveis circulantes de LDLox. Por outro lado, a concentração de selênio nas unhas teve efeito preditivo negativo sobre as concentrações de LDLox, sendo que o acréscimo de 1 unidade na concentração de selênio (1 ng/grama de unha), esteve associado a redução de 0,06 U/L nos níveis circulantes de LDLox. A concentração de cobre nas unhas teve efeito similar, no entanto não mostrou significância estatística.

Os indivíduos que se posicionaram no maior quartil ($\geq 91,81$ U/L) da distribuição dos níveis circulantes da LDLox, quando comparados àqueles no menor quartil ($<52,62$ U/L), demonstraram aumento de 240% (OR = 3,40; IC 95% = 1,15 a 9,96; $P = 0,03$) nas chances de apresentar concentrações séricas aumentadas de triacilgliceróis (Tabela 1.4).

Tabela 1.1: Parâmetros antropométricos, clínicos e bioquímicos (média ± DP) categorizados pelo valor da mediana (69,36 U/L) da concentração plasmática da LDLox

	LDLox ≤ 69,36 U/L (n=80)	LDLox > 69,36 U/L (n=80)	P
Idade (anos)	23,1 ± 3,6	23,4 ± 3,4	0,145
Peso Corporal (kg)	62,0 ± 12,2	63,0 ± 10,5	0,167
^{s*} IMC (kg/m ²)	21,6 ± 2,8	22,4 ± 3,0	0,046
Circunferência da Cintura (cm) ¹	78,0 ± 8,7	78,3 ± 8,7	0,863
Circunferência do Quadril (cm) ¹	95,1 ± 7,1	95,8 ± 6,4	0,493
Relação Cintura/Quadril	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,469
PC Tricipital (mm) ¹	18,2 ± 6,8	18,1 ± 7,1	0,967
PC Bicipital (mm)	7,4 ± 4,1	7,1 ± 3,7	0,331
PC Suprailiac (mm)	17,5 ± 8,3	19,0 ± 9,9	0,231
PC Subscapular (mm)	17,2 ± 6,8	18,4 ± 8,2	0,254
Soma das 4 PC (mm)	42,6 ± 16,8	45,0 ± 20,4	0,369
Gordura Troncular (%) ¹	57,4 ± 7,1	59,3 ± 6,1	0,069
Gordura Total (%) ¹	23,8 ± 6,1	23,4 ± 7,0	0,735
Massa de Gordura (kg)	15,0 ± 5,2	14,7 ± 5,4	0,303
Massa Livre de Gordura (kg)	47,1 ± 11,1	48,3 ± 9,1	0,154
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	10,9 ± 0,9	11,0 ± 0,9	0,239
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	7,4 ± 0,7	7,3 ± 0,7	0,257
Glicose (mg/dL)	90,8 ± 7,0	90,3 ± 6,3	0,394
Insulina (μU/mL) ^a	10,3 ± 5,0	10,2 ± 6,0	0,302
HOMA-IR ^a	2,3 ± 1,2	2,3 ± 1,3	0,245
^{s**} Colesterol Total (mg/dL) ¹	153,4 ± 27,8	166,5 ± 33,5	0,007
HDL-c (mg/dL) ^b	47,3 ± 12,4	45,7 ± 10,4	0,342
^{s**} LDL-c (mg/dL)	91,0 ± 26,6	100,2 ± 26,4	0,009
Triacilgliceróis (mg/dL)	96,1 ± 49,1	103,2 ± 38,5	0,059
^{s**} Relação Colesterol Total/HDL-c ^b	3,3 ± 0,6	3,8 ± 0,9	<0,001
^{s*} Ácido Úrico (mg/dL) ¹	3,4 ± 1,1	3,7 ± 1,1	0,049
Ceruloplasmina (mg/dL)	36,4 ± 7,4	38,1 ± 9,2	0,174
^{s*} Selênio (ng/g de unha) ^{1,c}	396,2 ± 88,0	365,5 ± 76,7	0,033
Zinco (μg/g de unha) ^c	124,5 ± 57,7	132,3 ± 68,7	0,212
Cobre (μg/g de unha) ^c	7,4 ± 5,5	7,1 ± 7,1	0,247
^{s**} Atividade da GPx (nmol/[mL/min]) ^d	487,9 ± 231,3	659,1 ± 299,2	0,002
CAT (mM) ^e	1,7 ± 0,8	1,6 ± 1,0	0,145

DP, desvio padrão; LDLox, lipoproteína de baixa densidade oxidada; IMC, índice de massa corporal; PC, prega cutânea; HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina; HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; GPx, glutatona peroxidase; CAT, capacidade antioxidante total do plasma

¹ teste *Student t* foi realizado para as variáveis com distribuição normal, as demais variáveis foram analisadas pelo teste *Mann-Whitney U*

^a n=79 para LDLox ≤ 69,36 U/L; n=77 para LDLox > 69,36 U/L

^b n=73 para LDLox ≤ 69,36 U/L

^c n=69 para LDLox ≤ 69,36 U/L; n=66 para LDLox > 69,36 U/L

^d n=44 para LDLox ≤ 69,36 U/L; n=56 para LDLox > 69,36 U/L

^e n=76 para LDLox ≤ 69,36 U/L; n=79 para LDLox > 69,36 U/L

^{s*} diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05)

^{s**} diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade (P < 0,01)

Tabela 1.2: Variáveis de estilo de vida e ingestão dietética diária (média ± DP) categorizadas pelo valor da mediana (69,36 U/L para variáveis de estilo de vida e 68,56 U/L para ingestão dietética diária) da concentração plasmática da LDLox

	LDLox ≤ 69,36 U/L (n=80)	LDLox > 69,36 U/L (n=80)	P
<i>Variáveis de Estilo de Vida</i>			
Uso de suplementação de vitaminas (%) ¹	6,2	6,2	0,721
Tabagismo (%) ^{1,a}	9,6	13,4	0,105
Prática regular de atividade física (%) ^{1,a}	72,6	70,1	0,116
Cigarros/dia ^a	1,3 ± 4,9	1,6 ± 4,9	0,318
MET (h/dia) ^a	29,6 ± 7,5	31,7 ± 11,0	0,162
	LDLox ≤ 68,56 U/L (n=69)	LDLox > 68,56 U/L (n=68)	P
<i>Ingestão Dietética Diária</i>			
Calorias (kcal) ²	2724,9 ± 791,1	2694,3 ± 702,7	0,811
Carboidrato (g)	355,7 ± 113,0	350,6 ± 100,9	0,412
Proteína (g) ²	104,2 ± 40,0	100,8 ± 27,9	0,561
Lipídio (g)	98,9 ± 32,3	94,2 ± 28,1	0,163
Fibra (g)	27,8 ± 16,2	25,0 ± 14,1	0,175
Colesterol (g) ²	212,2 ± 96,8	232,3 ± 97,2	0,228
Ácidos graxos saturados (g)	23,2 ± 9,1	21,7 ± 9,9	0,110
Ácidos graxos monoinsaturados (g)	16,9 ± 8,1	16,5 ± 10,1	0,202
Ácidos graxos poliinsaturados (g)	14,8 ± 8,0	13,7 ± 9,0	0,180
Vitamina A (mg)	872,9 ± 502,3	965,5 ± 560,3	0,180
Vitamina C (mg)	126,4 ± 113,1	117,4 ± 70,4	0,484
Ferro (mg)	19,3 ± 27,6	16,4 ± 12,8	0,353
Cobre (mg)	1,3 ± 0,7	1,3 ± 1,4	0,249
Zinco (mg)	8,7 ± 3,6	8,1 ± 3,6	0,181

DP, desvio padrão; LDLox, lipoproteína de baixa densidade oxidada; MET, índice metabólico equivalente

¹ teste *qui-quadrado* χ^2 test para variáveis categóricas

² teste *Student t* foi realizado para as variáveis com distribuição normal, as demais variáveis foram analisadas pelo teste *Mann-Whitney U*

^a n=73 para LDLox ≤ 69,36 U/L; n=67 para LDLox > 69,36 U/L

Tabela 1.3: Preditores da concentração plasmática da LDLox (U/L): regressão linear simples (n=160)^a

	coeficiente β (IC 95%)	P	r ²
<i>Preditores da LDLox</i>			
IMC (kg/m ²)	1,206 (-0,347 a 2,760)	0,127	0,008
Gordura Troncular (%)	0,489 (-0,193 to 1,172)	0,158	0,006
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	4,749 (-0,127 a 9,626)	0,056	0,016
^{s**} Colesterol Total (mg/dL)	0,228 (0,086 a 0,370)	0,001	0,054
^{s*} LDL-c (mg/dL)	0,216 (0,048 a 0,384)	0,012	0,033
Triacilgliceróis (mg/dL)	0,082 (-0,021 a 0,185)	0,118	0,009
^{s**} Relação Colesterol Total/HDL-c ¹	15,787 (10,776 a 20,798)	<0,001	0,198
^{s*} Ácido Úrico (mg/dL)	4,465 (0,342 a 8,588)	0,034	0,022
^{s*} Selênio (ng/g de unha) ²	-0,063 (-0,119 a -0,007)	0,025	0,029
Cobre (μ g/g de unha) ²	-0,573 (-1,322 a 0,176)	0,132	0,009
^{s**} Atividade da GPx (nmol/[mL/min]) ³	0,029 (0,008 a 0,050)	0,007	0,062
Colesterol (g/dia) ⁴	0,047 (-0,001 a 0,095)	0,055	0,019

LDLox, lipoproteína de baixa densidade oxidada; IMC, índice de massa corporal; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; HDL-c, lipoproteína de alta densidade; GPx, glutathiona peroxidase; IC, intervalo de confiança

^a ajuste prévio para sexo, idade, tabagismo e atividade física

¹n=153, ²n=135, ³n=100, ⁴n=137

^{s*} diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05)

^{s**} diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade (P < 0,01)

Tabela 1.4: Análise de Regressão Logística: razão de chances (OR) e IC 95% para os componentes da síndrome metabólica de acordo com a concentração plasmática da LDLox (n=160)

	Quartis da distribuição da LDLox (U/L) ¹		
	Q2 (52,62 a 69,36)	Q3 (69,36 a 91,81)	Q4 (≥ 91,81)
<i>Componentes da síndrome metabólica</i>			
	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
Obesidade Abdominal	1,00 (0,37 a 2,66)	0,87 (0,32 a 2,38)	1,00 (0,37 a 2,66)
^{s*} Hipertigliciridemia	2,14 (0,70 a 6,53)	1,41 (0,44 a 4,53)	3,40 (1,15 a 9,96)
HDL-c Reduzido ^a	0,44 (0,15 a 1,25)	0,73 (0,24 a 2,20)	0,73 (0,24 a 2,20)
Hipertensão Arterial	1,78 (0,61 a 5,21)	1,17 (0,38 a 3,62)	1,78 (0,61 a 5,21)
Hiperglicemia	1,28 (0,48 a 3,44)	1,00 (0,36 a 2,75)	1,00 (0,36 a 2,75)

IC, intervalo de confiança; OR, odds ratio; LDLox, lipoproteína de baixa densidade oxidada; HDL-c, lipoproteína de alta densidade;

Componentes da síndrome metabólica: obesidade abdominal (> percentil 75 da distribuição da circunferência da cintura, 83 cm); hipertigliciridemia (> percentil 75 da distribuição da concentração sérica de triacilgliceróis, 117,5 mg/dL); HDL-c reduzido (< percentil 75 da distribuição da concentração sérica da HDL-c, 53 mg/dL); hipertensão arterial (> percentil 75 da distribuição dos níveis de pressão arterial sistólica e diastólica, 12/8 mmHg); hiperglicemia (> percentil 75 da distribuição da concentração sérica da glicose, 95 mg/dL)

¹primeiro quartil da distribuição da LDLox (Q1 < 52,62), referência para o cálculo da OR

^an=153

^{s*} diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05), OR: Q4 versus Q1

2.4. Discussão

As modificações na LDL-c nativa têm despertado grande interesse devido ao seu papel etiológico no processo aterogênico. A oxidação é um dos processos de modificação mais estudados. Apesar da LDL-c não constar entre os critérios diagnósticos da síndrome metabólica, o aumento nas concentrações circulantes de partículas pequenas e densas desta lipoproteína (LDLpd), subfração mais suscetível à oxidação, é uma das principais alterações lipídicas que acompanham o estado de resistência à insulina e por conseguinte a síndrome metabólica (Reaven, Chen et al. 1993; Lamarche 1998; St-Pierre, Ruel et al. 2001; Knopp and Paramsothy 2006; Holvoet, Lee et al. 2008).

A LDL-c é o substrato para a reação de oxidação, mediada pela substituição do resíduo 60 de lisina da apolipoproteína B100, que resulta na geração da LDLox (Holvoet, Vanhaecke et al. 1998; Holvoet, Mertens et al. 2001; Holvoet 2006). Tal pressuposto está refletido na associação entre LDL-c e LDLox encontrada no presente estudo, bem como no fato da LDL-c predizer o aumento nos níveis circulantes de LDL oxidada. Estes achados encontram respaldo nos dados da literatura (Sjogren, Basu et al. 2005; Holvoet, Lee et al. 2008).

A presença da LDLox como agente pró-aterogênico é evidenciada desde a primeira fase da lesão aterogênica (formação das estrias gordurosas) até a ruptura dessas lesões na parede vascular. A LDLox atua no endotélio induzindo a expressão gênica do fator estimulador de colônia de macrófagos e da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), estimulando a replicação de macrófagos no espaço subendotelial e recrutando mais células inflamatórias para a lesão em formação (Ross 1999). Os macrófagos via receptores *scavengers*, captam LDLox e se transformam em células espumosas que migram para junto das células endoteliais formando as estrias gordurosas (Van Berkel, De Rijke et al. 1991; Ross 1999). Ao captarem LDLox, os macrófagos também estimulam a proliferação de linfócitos T *helper*, que por meio da produção de citocinas específicas implementam o processo inflamatório crônico, característico da aterosclerose (Horkko, Binder et al. 2000).

Concentrações elevadas de LDLox estão associadas a fatores de risco cardiovascular que são comuns à síndrome metabólica (Isomaa, Almgren et al. 2001; Sigurdardottir, Fagerberg et al. 2002; Holvoet, Kritchevsky et al. 2004; Lapointe, Couillard et al. 2007; Holvoet, Lee et al. 2008). Dados epidemiológicos corroboram tal associação, mostrando que a síndrome se associa com a

morbimortalidade por eventos cardiovasculares (Isomaa, Almgren et al. 2001; Reindel, Zander et al. 2004; Obunai, Jani et al. 2007).

A obesidade, particularmente o acúmulo de adiposidade visceral, medida indiretamente pela circunferência de cintura, vem sendo apontada como fator desencadeante de alterações metabólicas (Sowers 2003; Despres and Lemieux 2006). No presente estudo, não foi observada nenhuma associação significativa em relação à circunferência da cintura. No entanto, o percentual de gordura troncular, que segundo Warnberg, Nova et al. (2006) também constitui em indicador da distribuição centralizada da gordura corporal, se correlacionou positivamente à dosagem plasmática de LDLox, apesar de não ter sido capaz de prever o aumento nos seus níveis circulantes. Em estudo realizado com mulheres pós-menopáusicas, também não foi encontrada associação entre as concentrações plasmáticas de LDLox e a circunferência da cintura (Lapointe, Couillard et al. 2007). Estes autores sugeriram que tal associação não é direta, e sim mediada por alterações metabólicas decorrentes do acúmulo de gordura visceral, como a hipertrigliceridemia, o baixo nível circulante de HDL-c e a resistência à insulina, que por sua vez, estiveram associados ao aumento da concentração plasmática de LDLox. Verreth, De Keyzer et al. (2004) acrescentam que a associação entre as concentrações plasmáticas de LDLox e a circunferência da cintura está mediada pelo estresse oxidativo, uma vez que o incremento do tecido adiposo visceral determinou a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase) e o aumento de catalizadores (arachidonate-5-lipoxygenase) da oxidação da LDL-c. Weinbrenner, Schroder et al. (2006) ainda destacaram que a circunferência da cintura, independente do IMC, esteve associada ao aumento das concentrações de LDLox. Indivíduos com circunferência da cintura elevada (102 cm para homens e 88 para mulheres) mostraram um aumento de 110% nas chances (*Odds Ratio*: OR = 2,1; IC 95% = 1,2 a 3,6; P = 0,004) de apresentar níveis circulantes de LDLox também elevados ($\geq 97,4$ U/L) (Holvoet, Lee et al. 2008).

No presente estudo, a ausência de associações entre as concentrações de LDLox e outras medidas de adiposidade, como as pregas cutâneas, o percentual de gordura corporal e a massa de gordura corporal, possivelmente, se deve à predominância de indivíduos eutróficos (IMC < 25,0 kg/m²; 85%), de acordo com os pontos de corte preconizados pela Organização Mundial de Saúde (WHO 1998). No entanto, mesmo diante da pequena participação de indivíduos com sobrepeso ou obesidade (IMC $\geq 25,0$ kg/m²; 15%), já pôde ser observado que indivíduos cujos valores de LDLox estavam acima da mediana, demonstraram também maiores valores de IMC. A

associação positiva entre o IMC e a concentração plasmática de LDLox, encontra respaldo na literatura científica. O IMC esteve positivamente correlacionado ($r = 0,20$; $p < 0,001$) com os níveis plasmáticos de LDLox (Sigurdardottir, Fagerberg et al. 2002). Weinbrenner, Schroder et al. (2006) encontraram que indivíduos com sobrepeso e obesidade ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) apresentaram aumento de 130% nas chances ($OR = 2,30$) de apresentar concentrações de LDLox aumentadas ($> 74,0 \text{ U/L}$ para homens e $69,4 \text{ U/L}$ para mulheres), ao passo que em indivíduos de peso normal ($IMC < 25 \text{ kg/m}^2$) tal aumento de chances foi de apenas 67% ($OR = 1,67$). Da mesma forma, Holvoet, Lee et al. (2008) relataram associação positiva entre o marcador em questão e o IMC. Cabe ressaltar que, estudos que utilizaram a dosagem plasmática de LDLox como marcador de estresse oxidativo associado à obesidade, demonstraram redução nos seus níveis circulantes após a redução de peso, seja por tratamento cirúrgico (cirurgia bariátrica) (Uzun, Zengin et al. 2004) ou dietético (dieta hipocalórica por 12 semanas) (Porreca, Di Febbo et al. 2004).

Outros fatores, além do hemodinâmico, contribuem para a progressão da aterosclerose associada à hipertensão arterial (Hansson 1999). Partículas de LDL-c isoladas de pacientes hipertensos exibiram, *in vitro*, maior suscetibilidade à oxidação. O aumento das concentrações plasmáticas de anticorpos anti LDLox observado nestes pacientes, sugere que tal situação é também refletida *in vivo* (Maggi, Marchesi et al. 1993). Quinones-Galvan, Pucciarelli et al. (2001), em ensaio clínico duplo cego e randomizado, confirmaram a maior suscetibilidade da LDL-c à oxidação, em pacientes hipertensos ($151 \pm 3/99 \pm 1 \text{ mmHg}$). Tal suscetibilidade se deve, em parte, ao estímulo mecânico que a hipertensão exerce sobre as células musculares lisas da parede vascular, culminando na ativação da via de produção de radical ânion superóxido (Inoue, Kawashima et al. 1998). A associação positiva entre os níveis de pressão arterial sistólica e a concentração plasmática de LDLox, encontrada no presente estudo, ($r = 0,17$; $P = 0,027$) foi corroborada por Holvoet, Lee et al. (2008). Os mesmos autores ainda encontraram que, após o ajuste por covariáveis como a idade, o sexo, o tabagismo e a atividade física, os níveis de pressão arterial não mais se associaram às concentrações plasmáticas de LDLox ($OR = 0,9$; $IC 95\% = 0,2$ a $1,6$), tal como ocorreu no presente estudo, mediante análise de regressão simples. Por outro lado, Sigurdardottir, Fagerberg et al. (2002) e Lapointe, Couillard et al. (2007) não encontraram correlação significativa entre os níveis de pressão arterial e as concentrações de LDLox, em homens saudáveis com idade de 58 anos e mulheres pós-menopáusicas, respectivamente.

A cadeia transportadora de elétrons é uma das principais vias metabólicas de geração intracelular de radicais livres, especialmente o ânion superóxido (Mueller, Laude et al. 2005). O aumento na geração mitocondrial de superóxido é um provável fator desencadeante da resistência à insulina, mediada por alterações na sua cascata de sinalização, via efeito inibitório sobre as PTP's (*protein-tyrosine phosphatase*). Tal processo altera a síntese e a mobilização do transportador de glicose (GLUT-4) para a superfície da membrana celular, culminando nos estados de hiperinsulinemia e hiperglicemia (Helmersson, Vessby et al. 2004; Chiarugi 2005; Randriamboavonjy and Fleming 2009). A disfunção das células β pancreáticas, também decorrente do aumento dos radicais ânions superóxido, contribui para o processo em questão (Helmersson, Vessby et al. 2004). Segundo Sjogren, Basu et al. (2005) a associação entre os níveis aumentados de biomarcadores do estresse oxidativo e a resistência à insulina, possivelmente, é dependente da instalação crônica do estresse oxidativo, ou ainda de alterações nas respostas inflamatórias. Tal pressuposto é corroborado por (Helmersson, Vessby et al. (2004), uma vez que evidenciaram aumento nos níveis plasmáticos de 8-iso-PGF_{2 α} , marcador do dano oxidativo a lipídios, somente em indivíduos com diabetes diagnosticado há mais de 7 anos. No presente estudo, o fato dos indivíduos participantes serem jovens e saudáveis, possivelmente, justifica a ausência de associações entre os níveis circulantes de LDLox e as concentrações séricas de insulina e glicose.

As associações entre resistência à insulina e oxidação da fração LDL-c ainda permanecem controversas. Alguns autores demonstraram que tanto a hiperglicemia, componente da síndrome metabólica, quanto a hiperinsulinemia estiveram associadas ao aumento dos níveis circulantes de LDLox (Holvoet, Kritchevsky et al. 2004; Lapointe, Couillard et al. 2007; Holvoet, Lee et al. 2008). Outros autores não encontraram correlação significativa entre os níveis circulantes de LDLox e os de glicose (Sigurdardottir, Fagerberg et al. 2002; Sjogren, Basu et al. 2005) ou de insulina (Sjogren, Basu et al. 2005).

O perfil lipídico da síndrome metabólica é caracterizado por hipertrigliceridemia e diminuição da fração HDL-c (NCEP-ATPIII. 2001), além do aumento nos níveis plasmáticos de partículas pequenas e densas da LDL-c (LDLpd), subfração mais suscetível à oxidação (Reaven, Chen et al. 1993; Lamarche 1998; St-Pierre, Ruel et al. 2001; Knopp and Paramsothy 2006; Holvoet, Lee et al. 2008). Os resultados do presente estudo estão em concordância com os da literatura que demonstraram associação positiva entre os níveis plasmáticos de LDLox e as

concentrações séricas de colesterol total (Lapointe, Couillard et al. 2007), LDL-c (Sigurdardottir, Fagerberg et al. 2002; Sjogren, Basu et al. 2005; Lapointe, Couillard et al. 2007; Holvoet, Lee et al. 2008) e triacilgliceróis (Sigurdardottir, Fagerberg et al. 2002; Holvoet, Kritchevsky et al. 2004; Sjogren, Basu et al. 2005; Lapointe, Couillard et al. 2007; Holvoet, Lee et al. 2008). Lapointe, Couillard et al. (2007) ainda ressaltaram a concentração de triacilgliceróis como fator preditivo ($r^2 = 0,06$; $P < 0,001$) dos níveis circulantes de LDLox em mulheres posmenopausadas. No presente estudo, os maiores níveis de triacilgliceróis (> percentil 75) foi a única alteração relacionada à síndrome metabólica que se associou aos níveis circulantes da LDLox, cabendo destacar que o acréscimo de 15 U/L nas concentrações plasmáticas de LDLox associou-se ao aumento de 21,8% na chance de apresentar triacilgliceróis aumentado (> 117,5 mg/dL) (OR = 1,218; IC 95% = 0,1016 a 1,467; $P = 0,03$; dado não apresentado em tabela). Da mesma forma, os indivíduos que se posicionaram no maior quartil da distribuição dos níveis circulantes da LDLox, quando comparados àqueles no menor quartil, mostraram aumento de 240% (OR = 3,40; IC 95% = 1,15 a 9,96; $P = 0,03$) nas chances de apresentar concentrações séricas aumentadas de triacilgliceróis. Tais resultados encontram respaldo no fato da hipertrigliceridemia ser um potente estimulador da produção de partículas de LDLpd (Young, McFarlane et al. 2003).

A associação positiva encontrada entre LDL-c e LDLox se evidencia no sentido da LDL-c ser o substrato da reação de oxidação da qual resulta a LDLox (Holvoet, Vanhaecke et al. 1998; Holvoet, Mertens et al. 2001; Holvoet 2006). Cabe ressaltar que no presente estudo, os níveis séricos de LDL-c, bem como os de colesterol total e relação colesterol total/HDL-c, se constituíram em preditores positivos da concentração plasmática de LDLox. O aumento em 1 mg/dL nas concentrações séricas de colesterol total, LDL-c e 1 unidade na relação colesterol total/HDL-c, foram capazes de se associar ao aumento de, respectivamente, 0,22 U/L; 0,21 U/L e 15,78 U/L nos níveis circulantes de LDLox (Tabela 1.3). Castelli (1988), com base nos dados do *Framingham Heart Study*, apontou tal índice (colesterol total/HDL-c) como fator potencialmente associado ao desenvolvimento de doenças coronarianas arteriais, entre elas a aterosclerose. O efeito dos lipídios séricos em determinar o aumento dos níveis circulantes de LDLox, é de grande relevância, uma vez que o presente estudo foi conduzido com indivíduos, predominantemente, normolipidêmicos (colesterol total < 200 mg/dL; 92,5% e LDL-c < 160 mg/dL; 97,5%). Foram considerados os pontos de corte da IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemia e Prevenção de Aterosclerose (SBC 2007).

Estudos epidemiológicos apontam o efeito preditivo da hiperuricemia sobre o risco de ocorrência de eventos cardiovasculares (Culleton, Larson et al. 1999; Fang and Alderman 2000). No entanto, esses estudos divergem em relação à natureza independente de tal efeito. (Niskanen, Laaksonen et al. (2004) ressaltam que diante da influência sofrida por diversos fatores, seria complicado conceber como independente, o efeito que os níveis de ácido úrico exercem sobre o risco cardiovascular. Entre esses fatores desatacam-se além dos componentes da síndrome metabólica, outros fatores associados ao processo aterogênico, como estresse oxidativo, estado inflamatório e disfunção endotelial (Hayden and Tyagi 2004). Considerando que o ácido úrico é um potente antioxidante endógeno (Hayden and Tyagi 2004) e que o processo aterosclerótico está intimamente associado à instalação do estresse oxidativo (Katakami, Sakamoto et al. 2009), é paradoxal o efeito da hiperuricemia como preditor do risco cardiovascular. Neste contexto, Niskanen, Laaksonen et al. (2004) suscitaram a hipótese de que o aumento nos níveis de ácido úrico, diante de condições oxidantes, pode se constituir em mecanismo adaptativo. Hayden and Tyagi (2004) defendem que em condições pró-oxidantes, paradoxalmente, o ácido úrico afasta-se de sua original capacidade antioxidante e converte-se em oxidante, o que possivelmente, desencadeia a expressão de outros compostos, potencialmente antioxidantes, no sentido de restaurar o equilíbrio redox. Cicoira, Zanolla et al. (2002) acrescentam que a síntese de ácido úrico catalisada pela xantina-oxidase gera radicais ânion superóxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio. Tais pressupostos justificam as maiores concentrações séricas de ácido úrico associadas aos maiores níveis circulantes de LDLox (indivíduos cujos valores de LDLox estavam acima da mediana mostraram maiores valores de ácido úrico), bem como o efeito preditor positivo do ácido úrico sobre os níveis de LDLox, sendo que o acréscimo de 1 mg/dL nos níveis séricos de ácido úrico associou-se ao aumento da concentração plasmática de LDLox em 4,4 U/L (Tabela 1.3). Vekic, Jelic-Ivanovic et al (2009) corroboram esses achados, uma vez que, apontaram os níveis elevados de ácido úrico ($\geq 318\mu\text{mol/L}$) como fator preditivo positivo da ocorrência de partículas pequenas e densas da LDL-c (LDLpd), mais suscetíveis à oxidação.

Considerando que a GPx é um importante componente enzimático, integrante do sistema de defesa antioxidante (Halliwell and Whiteman 2004; Vincent, Innes et al. 2007), é ainda possível inferir que a maior atividade da GPx, associada aos maiores níveis de LDLox, pode também constituir-se em um mecanismo adaptativo, como foi apontado para o ácido úrico. O efeito preditivo positivo da atividade da glutathiona peroxidase sobre os níveis circulantes de

LDLox, foi corroborado por Shen, Zhao et al. (2003) que ressaltam aumento da atividade dessa enzima em células endoteliais tratadas com LDLox, sugerindo que tal aumento consiste em mecanismo protetor contra a geração aumentada de espécies reativas de oxigênio induzida pela LDLox. A ação indutora da LDLox sobre a geração de espécies reativas de oxigênio foi confirmada por Chowdhury, Sangle et al. (2009) com base no estudo da atividade da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.

A dosagem de minerais antioxidantes (cobre, selênio e zinco) na unha é capaz de refletir sua ingestão dietética habitual (6 a 12 meses precedentes) (Hunter, Morris et al. 1990). Essas dosagens se constituem em fatores protetores do risco cardiovascular. Sukumar and Subramanian (2007) encontraram que as concentrações de cobre e zinco nas unhas de indivíduos do grupo controle superaram as daqueles que manifestaram eventos cardiovasculares. Puchau, Zulet et al. (2009) ainda apontaram que a dosagem de cobre na unha correlacionou-se negativamente aos níveis plasmáticos de homocisteína ($r = -0,165$; $P = 0,049$), outro marcador do risco cardiovascular. No presente estudo evidenciou-se, pela primeira vez, que a dosagem de selênio na unha teve efeito preditor negativo sobre as concentrações de LDLox, sendo que o aumento de 1 ng/g de unha foi capaz de se associar à diminuição de 0,06 U/L de LDLox (Tabela 1.3). Anteriormente, Puchau, Zulet et al. (2009) corroboraram que em adultos jovens, as dosagens de selênio e zinco nas unhas estiveram negativamente associadas aos níveis séricos de *asymmetric dimethylarginine* (ADMA), marcador do estresse oxidativo.

Exceto pela correlação encontrada entre ingestão diária de colesterol e concentração plasmática de LDLox, nenhum outro parâmetro dietético se associou aos níveis circulantes deste marcador. Estes resultados encontram respaldo no estudo de Sjogren, Basu et al. (2005) que apontou a inexistência de correlações entre fatores dietéticos e concentração plasmática de LDLox. Lapointe, Couillard et al. (2006) revisaram o efeito da ingestão dietética sobre a oxidação das partículas de LDL-c, concluindo que o papel dos nutrientes e alimentos isolados ainda é controverso, no entanto, aponta o padrão dietético mediterrâneo, ao qual é inerente a interação entre distintos nutrientes e alimentos antioxidantes, como fator associado à diminuição da suscetibilidade à oxidação da fração LDL-c. Barbosa, Bressan et al. (2008) ressaltam que os estudos concernentes à avaliação dos efeitos dos fatores dietéticos sobre o biomarcadores do estresse oxidativo apresentam importante heterogeneidade metodológica relacionada às características dos indivíduos estudados (sexo, idade, IMC, estado de saúde, tabagismo entre

outros) e à variabilidade da intervenção realizada (dose e tempo de suplementação, conteúdo de antioxidantes, características do hábito alimentar e tempo das intervenções dietéticas), sendo tais fatores determinantes de resultados ainda controversos.

Diante do exposto, a gordura troncular apesar de não ter sido capaz de prever aumento nos níveis circulantes da LDLox em indivíduos jovens, saudáveis e predominantemente eutróficos, esteve aumentada entre aqueles cujos níveis de LDLox estavam acima da mediana. Cabe ainda ressaltar que, mesmo se tratando de indivíduos normolipidêmicos, o aumento nos níveis séricos de colesterol total e LDL-c, bem como a relação colesterol total/HDL-c já foi capaz de determinar o aumento nos níveis circulantes de LDLox. O papel da hiperuricemia como fator de risco aterogênico merece destaque e pode ser apontado como indicador precoce de tal processo. No presente estudo, mesmo considerando que os indivíduos apresentaram níveis normais de ácido úrico (< 7 mg/dL), este componente já se mostrou capaz de prever o aumento nas concentrações de LDLox (importante marcador de risco do processo aterosclerótico). Diante da associação positiva entre os níveis de LDLox e atividade enzimática da glutathione peroxidase, sugere-se a possível ocorrência de um mecanismo regulatório, no qual diante de condições oxidantes (maiores níveis de LDLox), há um aumento da atividade antioxidante da referida enzima. Acredita-se que esse aumento ocorre no sentido de restabelecer o balanço redox e que tal mecanismo regulatório ocorra, sobretudo, em indivíduos saudáveis, uma vez que antes da instalação de um processo patológico, o organismo ainda é capaz de restaurar o equilíbrio homeostático. A concentração de selênio na urina foi pela primeira vez, apontado como preditor negativo das concentrações plasmáticas de LDLox. Este resultado é interessante, uma vez que a avaliação da ingestão dietética de selênio é bastante enviesada, devido à escassez de informações nas tabelas de composição de alimentos e pelo fato das suas concentrações no alimento serem potencialmente influenciadas pela quantidade deste mineral no solo. Dessa forma, a dosagem do mineral na urina, surge como alternativa interessante, pois além de se constituir em um procedimento não invasivo, pode refletir a ingestão dietética habitual desse mineral. Por fim, o estudo contribuiu para o melhor entendimento das associações entre o marcador de interesse (LDLox) e os fatores de risco para a ocorrência da síndrome metabólica, em um estágio precoce. Esse conhecimento pode ser útil no planejamento de ações de prevenção e controle de alterações relacionadas ao desenvolvimento da síndrome metabólica.

2.5. Referências bibliográficas

- Ainsworth, B. E., W. L. Haskell, et al. (1993). "Compendium of physical activities: classification of energy costs of human physical activities." Med Sci Sports Exerc **25**(1): 71-80.
- Ainsworth, B. E., W. L. Haskell, et al. (2000). "Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities." Med Sci Sports Exerc **32**(9 Suppl): S498-504.
- Amorim, P. R. and T. N. P. Gomes (2003). Métodos de baixo custo e aplicáveis na prática. Gasto energético na atividade física. P. R. Amorim and T. N. P. Gomes. Rio de Janeiro, Shape: 113 - 194.
- Barbosa, K. B., J. Bressan, et al. (2008). "[Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans]." An Sist Sanit Navar **31**(3): 259-80.
- Castelli, W. P. (1988). "Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease--the Framingham Heart Study." Can J Cardiol **4 Suppl A**: 5A-10A.
- Chiarugi, P. (2005). "PTPs versus PTKs: the redox side of the coin." Free Radic Res **39**(4): 353-64.
- Chowdhury, S. R., G. Sangle, et al. (2009). "P275 Effects of oxidized or glycated LDL on mitochondrial respiratory chain activity and enzymes in arterial endothelial cells." Atherosclerosis Supplements **10**(2): e582.
- Cicoira, M., L. Zanolla, et al. (2002). "Elevated serum uric acid levels are associated with diastolic dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy." Am Heart J **143**(6): 1107-11.
- Culleton, B. F., M. G. Larson, et al. (1999). "Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: the Framingham Heart Study." Ann Intern Med **131**(1): 7-13.
- Despres, J. P. and I. Lemieux (2006). "Abdominal obesity and metabolic syndrome." Nature **444**(7121): 881-7.
- DietPRO (2009). DietPRO, AS sistemas, versão 5.0. Viçosa.
- Durnin, J. V. and J. Womersley (1974). "Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years." Br J Nutr **32**(1): 77-97.
- Fang, J. and M. H. Alderman (2000). "Serum uric acid and cardiovascular mortality the NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971-1992. National Health and Nutrition Examination Survey." Jama **283**(18): 2404-10.

- Friedewald, W. T., R. I. Levy, et al. (1972). "Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge." Clin Chem **18**(6): 499-502.
- Halliwell, B. and M. Whiteman (2004). "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?" Br J Pharmacol **142**(2): 231-55.
- Hansson, L. (1999). "The Hypertension Optimal Treatment study and the importance of lowering blood pressure." J Hypertens Suppl **17**(1): S9-13.
- Hayden, M. R. and S. C. Tyagi (2004). "Uric acid: A new look at an old risk marker for cardiovascular disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: The urate redox shuttle." Nutr Metab (Lond) **1**(1): 10.
- Helmersson, J., B. Vessby, et al. (2004). "Association of type 2 diabetes with cyclooxygenase-mediated inflammation and oxidative stress in an elderly population." Circulation **109**(14): 1729-34.
- Holvoet, P. (2006). "Obesity, the metabolic syndrome, and oxidized LDL." Am J Clin Nutr **83**(6): 1438; author reply 1438-9.
- Holvoet, P., S. B. Kritchevsky, et al. (2004). "The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort." Diabetes **53**(4): 1068-73.
- Holvoet, P., D. H. Lee, et al. (2008). "Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome." Jama **299**(19): 2287-93.
- Holvoet, P., A. Mertens, et al. (2001). "Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(5): 844-8.
- Holvoet, P., J. Vanhaecke, et al. (1998). "Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease." Circulation **98**(15): 1487-94.
- Horkko, S., C. J. Binder, et al. (2000). "Immunological responses to oxidized LDL." Free Radic Biol Med **28**(12): 1771-9.
- Hunter, D. J., J. S. Morris, et al. (1990). "Predictors of selenium concentration in human toenails." Am J Epidemiol **132**(1): 114-22.

- Inoue, N., S. Kawashima, et al. (1998). "Stretch force on vascular smooth muscle cells enhances oxidation of LDL via superoxide production." Am J Physiol **274**(6 Pt 2): H1928-32.
- Isomaa, B., P. Almgren, et al. (2001). "Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome." Diabetes Care **24**(4): 683-9.
- Kassi, E., M. Dalamaga, et al. (2009). "Circulating oxidized LDL levels, current smoking and obesity in postmenopausal women." Atherosclerosis **205**(1): 279-83.
- Katakami, N., K. Sakamoto, et al. (2009). "Combined effect of oxidative stress-related gene polymorphisms on atherosclerosis." Biochem Biophys Res Commun **379**(4): 861-5.
- Knopp, R. H. and P. Paramsothy (2006). "Oxidized LDL and abdominal obesity: a key to understanding the metabolic syndrome." Am J Clin Nutr **83**(1): 1-2.
- Lamarche, B. (1998). "Abdominal obesity and its metabolic complications: implications for the risk of ischaemic heart disease." Coron Artery Dis **9**(8): 473-81.
- Lapointe, A., C. Couillard, et al. (2006). "Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles." J Nutr Biochem **17**(10): 645-58.
- Lapointe, A., C. Couillard, et al. (2007). "Circulating oxidized LDL is associated with parameters of the metabolic syndrome in postmenopausal women." Atherosclerosis **191**(2): 362-8.
- Maggi, E., E. Marchesi, et al. (1993). "Low-density lipoprotein oxidation in essential hypertension." J Hypertens **11**(10): 1103-11.
- Matthews, D. R., J. P. Hosker, et al. (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." Diabetologia **28**(7): 412-9.
- Mueller, C. F., K. Laude, et al. (2005). "ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(2): 274-8.
- Navarro-Blasco, I. and J. I. Alvarez-Galindo (2004). "Selenium content of Spanish infant formulae and human milk: influence of protein matrix, interactions with other trace elements and estimation of dietary intake by infants." J Trace Elem Med Biol **17**(4): 277-89.
- NCEP-ATPIII. (2001). "Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)." Jama **285**(19): 2486-97.

- Niskanen, L. K., D. E. Laaksonen, et al. (2004). "Uric acid level as a risk factor for cardiovascular and all-cause mortality in middle-aged men: a prospective cohort study." Arch Intern Med **164**(14): 1546-51.
- Obunai, K., S. Jani, et al. (2007). "Cardiovascular morbidity and mortality of the metabolic syndrome." Med Clin North Am **91**(6): 1169-84, x.
- Perloff, D., C. Grim, et al. (1993). "Human blood pressure determination by sphygmomanometry." Circulation **88**(5 Pt 1): 2460-70.
- Porreca, E., C. Di Febbo, et al. (2004). "Circulating leptin is associated with oxidized LDL in postmenopausal women." Atherosclerosis **175**(1): 139-43.
- Puchau, B., M. A. Zulet, et al. (2009). "Nail Antioxidant Trace Elements Are Inversely Associated with Inflammatory Markers in Healthy Young Adults." Biol Trace Elem Res **doi: 10.1007/s12011-009-8443-5**.
- Quinones-Galvan, A., A. Pucciarelli, et al. (2001). "Effective blood pressure treatment improves LDL-cholesterol susceptibility to oxidation in patients with essential hypertension." J Intern Med **250**(4): 322-6.
- Randriamboavonjy, V. and I. Fleming (2009). "Insulin, insulin resistance, and platelet signaling in diabetes." Diabetes Care **32**(4): 528-30.
- Reaven, G. M., Y. D. Chen, et al. (1993). "Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense low density lipoprotein particles." J Clin Invest **92**(1): 141-6.
- Reindel, J., E. Zander, et al. (2004). "[The metabolic syndrome in patients with type 1 diabetes mellitus. Associations with cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity]." Herz **29**(5): 463-9.
- Roberts, C. K. and K. K. Sindhu (2009). "Oxidative stress and metabolic syndrome." Life Sci **84**(21-22): 705-12.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-26.
- Salas-Salvado, J., M. A. Rubio, et al. (2007). "[SEEDO 2007 Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria]." Med Clin (Barc) **128**(5): 184-96; quiz 1 p following 200.
- SAS (2001). SAS Institute Inc., User's guide, version 8.0 (licenciado pela UFV). Cary, NC 27513, E.U.A.

- SBC (2007). "Sociedade Brasileira de Cardiologia, IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção de aterosclerose." Arquivos Brasileiros de Cardiologia **88**(suppl. 1): doi: 10.1590/S0066-782X2007000700002
- Shen, G., F. Z. Zhao, et al. (2003). "4P-0964 Impact of oxidized and glycated low-density lipoproteins on reactive oxygen species and glutathione redox system in vascular endothelial cells." Atherosclerosis Supplements **4**(2): 286.
- Sigurdardottir, V., B. Fagerberg, et al. (2002). "Circulating oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year-old men (AIR study)." J Intern Med **252**(5): 440-7.
- Sjogren, P., S. Basu, et al. (2005). "Measures of oxidized low-density lipoprotein and oxidative stress are not related and not elevated in otherwise healthy men with the metabolic syndrome." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(12): 2580-6.
- Sowers, J. R. (2003). "Obesity as a cardiovascular risk factor." Am J Med **115 Suppl 8A**: 37S-41S.
- St-Pierre, A. C., I. L. Ruel, et al. (2001). "Comparison of various electrophoretic characteristics of LDL particles and their relationship to the risk of ischemic heart disease." Circulation **104**(19): 2295-9.
- Sukumar, A. and R. Subramanian (2007). "Relative element levels in the paired samples of scalp hair and fingernails of patients from New Delhi." Sci Total Environ **372**(2-3): 474-9.
- Tremblay, A. J., H. Morrissette, et al. (2004). "Validation of the Friedewald formula for the determination of low-density lipoprotein cholesterol compared with beta-quantification in a large population." Clin Biochem **37**(9): 785-90.
- Tsimikas, S. (2006). "Oxidized low-density lipoprotein biomarkers in atherosclerosis." Curr Atheroscler Rep **8**(1): 55-61.
- Uzun, H., K. Zengin, et al. (2004). "Changes in leptin, plasminogen activator factor and oxidative stress in morbidly obese patients following open and laparoscopic Swedish adjustable gastric banding." Obes Surg **14**(5): 659-65.
- Van Berkel, T. J., Y. B. De Rijke, et al. (1991). "Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. Recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells." J Biol Chem **266**(4): 2282-9.

- Vekic, J., Z. Jelic-Ivanovic, et al. (2009). "High serum uric acid and low-grade inflammation are associated with smaller LDL and HDL particles." *Atherosclerosis* **203**(1): 236-42.
- Verreth, W., D. De Keyzer, et al. (2004). "Weight-loss-associated induction of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma correlate with reduced atherosclerosis and improved cardiovascular function in obese insulin-resistant mice." *Circulation* **110**(20): 3259-69.
- Vincent, H. K., K. E. Innes, et al. (2007). "Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity." *Diabetes Obes Metab* **9**(6): 813-39.
- Warnberg, J., E. Nova, et al. (2006). "Inflammatory proteins are related to total and abdominal adiposity in a healthy adolescent population: the AVENA Study." *Am J Clin Nutr* **84**(3): 505-12.
- Weinbrenner, T., H. Schroder, et al. (2006). "Circulating oxidized LDL is associated with increased waist circumference independent of body mass index in men and women." *Am J Clin Nutr* **83**(1): 30-5; quiz 181-2.
- WHO (1998). "World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic." *WHO Technical Report Series* 894.
- Young, I. S., C. McFarlane, et al. (2003). "Oxidative modification of triacylglycerol-rich lipoproteins." *Biochem Soc Trans* **31**(Pt 5): 1062-5.

3. CAPÍTULO 2

Ingestão calórica diminuída melhora a capacidade antioxidante total do plasma

3.1. Introdução

A produção contínua de radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio (EROs) durante os processos metabólicos de organismos aeróbicos, culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante (Gutteridge 1994; Halliwell 1997). Estes agem impedindo a produção de EROs, atuando na sua eliminação e/ou promovendo a reparação de danos oxidativos (Reiter, 1995; Koracevic, Koracevic et al. 2001). O sistema de defesa antioxidante inclui algumas enzimas com tal capacidade, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase; macromoléculas como albumina, ceruloplasmina e ferritina, e ainda outros compostos, como o ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, glutathione reduzida, ácido úrico e bilirrubina (Wayner, Burton et al. 1987; Halliwell 1997).

Estudos *in vitro* evidenciam a habilidade dos antioxidantes dietéticos em eliminar as EROs/ou impedir sua ação deletéria (Terao, Piskula et al. 1994; Serafini, Laranjinha et al. 2000; Duarte and Jones 2007). No entanto, estudos *in vivo* demonstram resultados divergentes no tocante ao efeito de antioxidantes dietéticos sobre a CAT (Steinberg and Chait 1998; Pellegrini, Riso et al. 2000; Huang, Appel et al. 2002; Visioli, Riso et al. 2003; Fito, Cladellas et al. 2005; Dunstan, Breckler et al. 2007; Karlsen, Retterstol et al. 2007). Nesse contexto, é pertinente afirmar que as complexas interações existentes entre os vários antioxidantes limitam a extrapolação de evidências provenientes de estudos *in vitro* (Serafini, Laranjinha et al. 2000). Tais interações se devem a vários fatores, entre eles destacam-se: a competição pela absorção intestinal e transporte sérico; possível efeito cooperativo entre antioxidantes, onde um regenera e/ou poupa a atividade de outro e ainda, a divergência quanto ao efeito antioxidante de um determinado composto diante de diferentes concentrações (Crews, Alink et al. 2001).

Diante do exposto, é de extrema importância considerar a interação existente entre os vários compostos antioxidantes inseridos no contexto de um padrão dietético, em detrimento do estudo do efeito de nutrientes ou alimentos isolados. A maior adesão ao padrão dietético mediterrâneo vem sendo correlacionada ao aumento da CAT de fluidos biológicos (Leighton, Cuevas et al. 1999; Pitsavos, Panagiotakos et al. 2005). Da mesma forma, padrões dietéticos

baseados na restrição calórica se associam ao aumento das defesas antioxidantes (Skrha, Kunesova et al. 2005).

Estudos prévios evidenciaram a diminuição significativa da CAT mediante condições patológicas associadas ao estresse oxidativo (Opara, Abdel-Rahman et al. 1999; Demirbag, Yilmaz et al. 2005; Kurban, Mehmetoglu et al. 2008). Sugere-se que essa depleção ocorra, especialmente, em indivíduos obesos. Chrysohoou, Panagiotakos et al. (2007) encontraram que a obesidade, sobretudo, o acúmulo de adiposidade visceral, esteve correlacionado à diminuição da CAT. Tal acúmulo constitui o elo entre o estresse oxidativo e as alterações metabólicas como a resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia e hipertensão arterial, que em conjunto caracterizam a síndrome metabólica (Furukawa, Fujita et al. 2004; Despres and Lemieux 2006; Roberts and Sindhu 2009).

No entanto, em indivíduos saudáveis e não obesos, não estão ainda estabelecidas, as possíveis associações existentes entre a CAT e fatores de risco para a síndrome metabólica. Parâmetros antropométricos e de composição corporal, bioquímicos, clínicos e dietéticos, se constituem em indicadores precoces do desenvolvimento de alterações metabólicas, que uma vez instaladas irão predispor à ocorrência da síndrome metabólica, processo intimamente relacionado ao estresse oxidativo. Existe um considerável interesse na CAT do plasma como marcador da habilidade do sistema de defesa antioxidante, cuja atuação é um fator determinante na manutenção da saúde e na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis.

O presente estudo se propôs a investigar, em indivíduos jovens e saudáveis, as possíveis associações existentes entre a CAT do plasma e os fatores de risco para a ocorrência da síndrome metabólica: parâmetros antropométricos, bioquímicos, clínicos e dietéticos; e, alguns componentes do sistema de defesa antioxidante: de origem endógena ou exógena.

3.2. Voluntários e métodos

3.2.1. Voluntários

O presente estudo avaliou 156 indivíduos jovens e saudáveis, com idade entre 18 e 35 anos (91 mulheres e 65 homens; idade: $23,1 \pm 3,5$ anos [média \pm DP]; índice de massa corporal: $22,0 \pm 2,9$ kg/m² [média \pm DP]).

Para a triagem inicial dos voluntários considerou-se como critérios de exclusão a evidência de qualquer doença relacionada ao estresse oxidativo, inflamação

crônica, desequilíbrios hídricos, mudanças na composição corporal ou presença de alterações na absorção e/ou metabolismo de nutrientes. Outros critérios de exclusão se referiram ao uso de medicamentos ou tratamento nutricional que afetasse o balanço energético, consumo alimentar, perfil lipídico, concentrações plasmáticas de insulina e metabolismo da glicose; o início do uso regular de anticoncepcionais nos 2 meses anteriores à participação no presente estudo; adesão à práticas dietéticas para a perda de peso ou peso instável nos últimos 6 meses (perda ou ganho de 10% do peso corporal).

Em conformidade com os princípios da declaração de *Helsinki* e após explicação clara sobre o protocolo do estudo, cada participante assinou o termo de consentimento livre e esclarecido, permitindo sua participação voluntária. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (Of. ref. N ° 009/2006).

3.2.2. Parâmetros antropométricos e de composição corporal

A estatura foi aferida utilizando-se estadiômetro (*Seca 206 model, Hamburg, Germany*), com extensão máxima de 2 metros, subdividido em milímetros. Para a aferição do peso corporal utilizou-se balança digital eletrônica (*Tanita TBF-300A model, Tokyo, Japan*), com capacidade máxima de 180 quilogramas e aproximação de 100 gramas. O índice de massa corporal foi calculado pela razão entre o peso corporal (quilogramas) e a estatura ao quadrado (metros).

A circunferência da cintura foi medida no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca e a do quadril na maior circunferência horizontal entre a cintura e os joelhos, sem contração gluteal (Salas-Salvado, Rubio et al. 2007). Ambas as circunferências foram aferidas utilizando-se fita métrica flexível e inelástica, subdividida em milímetros. Foi calculada a relação entre as circunferências da cintura e quadril.

As pregas cutâneas tricípital, bicipital, subescapular e suprailíaca foram aferidas utilizando-se adipômetro (*Lange caliper, Cambridge Scientific Industries Inc., Cambridge, Maryland, USA*) com aproximação de 1 milímetro, conforme técnica previamente padronizada (Durnin and Womersley 1974). Procedeu-se ao cálculo do percentual de gordura troncular pela razão entre o somatório das pregas cutâneas subescapular e suprailíaca e o somatório das 4 pregas cutâneas (Warnberg, Nova et al. 2006).

O percentual de gordura corporal total foi obtido mediante análise da bioimpedância elétrica horizontal (*Biodynamics 310 model, Washington, USA*), a partir da qual também foram estimados a massa de gordura e livre de gordura corporal em quilogramas.

3.2.3. Pressão arterial

Os níveis de pressão arterial sistólica e diastólica foram aferidos mediante esfigmomanômetro mecânico de coluna de mercúrio (BIC, São Paulo, Brasil), com aproximação de 2 mmHg, conforme técnica descrita anteriormente (Perloff, Grim et al. 1993).

3.2.4. Análise de amostras biológicas

A coleta de sangue foi realizada por punção venosa, após jejum de 12 horas. As amostras de plasma EDTA (*ethylene-diaminetetra-acetic-acid*), plasma heparina e soro foram separadas do sangue total mediante centrifugação a 2465 g a 5°C por 15 minutos (*Eppendorf AG, 5804R model, Hamburg, Germany*). Os eritrócitos foram obtidos por centrifugação a 1811 g a 5°C por 10 minutos. As amostras foram imediatamente armazenadas a -80°C até o momento das análises.

As concentrações séricas de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-c), triacilgliceróis, ácido úrico e ceruloplasmina (mg/dL), foram analisadas por ensaio colorimétrico ou turbidimétrico, mediante analisador automático (*BS-200, Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co., Nanshan, China*) utilizando-se kits de análise específicos (*BS-200, Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co., Nanshan, China*).

A lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) foi calculada pela equação de Friedwald, previamente estabelecida (Friedewald, Levy et al. 1972) e posteriormente validada (Tremblay, Morrissette et al. 2004). Procedeu-se também ao cálculo da razão colesterol total/HDL-c, conforme preconizado (Castelli 1988).

A concentração plasmática de insulina (sensibilidade de 2 µU/mL) foi analisada por ensaio imuno enzimático, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando-se material e reagentes providos por kit de análise específico (*Linco Research, St. Charles, USA*): placa recoberta com anticorpo de captura anti insulina humana (anticorpo monoclonal de coelho); anticorpo de detecção anti insulina humana (anticorpo monoclonal de coelho biotinizado) e substrato TMB (*3, 3', 5, 5'- tetrametilbenzidina*). Procedeu-se à dosagem em plasma EDTA, o ensaio foi realizado conforme protocolo descrito no kit de análise.

A resistência à insulina foi estimada pelo modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR), previamente estabelecido (Matthews, Hosker et al. 1985).

A capacidade antioxidante total (CAT) do plasma foi aferida por ensaio colorimétrico, por meio de kit de análise específico (*Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, catalog no. 709001*). O ensaio foi baseado na habilidade de todos os antioxidantes presentes na amostra (plasma) em inibir a oxidação do substrato oxidável ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) a ABTS^{•+} pela metimioglobina. A quantidade de substrato oxidado (ABTS^{•+}) foi monitorada por leitura de absorbância a 750 nm. O decaimento da absorbância a 750 nm foi diretamente proporcional à concentração de antioxidantes no plasma, expressa em mM de trolox equivalente, antioxidante sintético, hidrossolúvel, análogo a vitamina E.

As concentrações plasmáticas de LDL oxidada (LDLox; sensitivity < 6.56 U/L) foram analisadas por ELISA, utilizando-se material e reagentes providos por kit de análise específico (*Mercodia, Uppsala, Suécia*): placa recoberta com anticorpo de captura anti LDLox humana (anticorpo monoclonal de camundongo, murino específico, mAB-4E6); anticorpo monoclonal de camundongo anti Apo B 100, conjugado à peroxidase, diluído a 1:10 e substrato TMB, contendo peróxido de hidrogênio e cromóforo. Procedeu-se à dosagem em plasma EDTA, com diluição a 1:6561, o ensaio foi realizado conforme protocolo descrito no kit de análise.

A atividade eritrocitária da glutathione peroxidase (GPx) foi aferida por ensaio de cinética enzimática, mediante kit de análise específico (*Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, catalog no. 703102*). O ensaio se baseou na ocorrência de duas reações acopladas. A primeira catalisada pela GPx, referente à redução do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) à água, às custas da conversão da glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSH). A GSSH refere-se ao substrato para da segunda reação, catalizada por outra enzima, a glutathione redutase, que recupera a GSH às custas da oxidação do NADPH a NADP⁺. A oxidação do NADPH foi acompanhada por decaimento da absorbância a 340 nm, diretamente proporcional a atividade eritrocitária da GPx, expressa em nmol/mL/minuto, referente a quantidade de GPx capaz de oxidar 1 nmol de NADPH por mL de amostra por minuto.

Foram coletadas as amostras de unhas dos pés e das mãos, mediante limpeza prévia com água e sabão e retirada de esmalte e, em seguida, armazenadas a temperatura ambiente, em sacos de polipropileno. O preparo das amostras incluía seu tratamento ácido sob aquecimento (ácido nítrico fervente), sob altas pressões, em recipiente de teflon (digestor), usando um sistema de

digestão de microondas (*Ethos Plus, Millestone, Sorisole, Italy*). Após a digestão ácida, as concentrações de cobre, zinco e selênio foram analisadas por espectrofotometria de absorção atômica de chama (*Perkin Elmer AAnalyst 800; Norwalk, CT, USA*), conforme técnica estabelecida anteriormente (Navarro-Blasco and Alvarez-Galindo 2004). Os valores de concentração foram ajustados para o peso da amostra, e foram expressas em micrograma por grama de unha ($\mu\text{g/g}$ de unha) para o cobre e o zinco e em nanograma por grama de unha (ng/grama de unha) para o selênio.

3.2.5. Consumo alimentar e variáveis de estilo de vida

A ingestão dietética diária (calorias, carboidrato, proteína, lipídio, fibra, colesterol, ácidos graxos saturados, mono e poliinsaturados, vitaminas C e A, ferro, cobre e zinco) foi avaliada mediante aplicação de registro alimentar de 72 horas, utilizando-se software específico, *DietPRO, versão 5.0, AS sistemas* (DietPRO 2009). Os voluntários eram orientados a registrar em formulário próprio todos os alimentos e bebidas consumidos, bem como suas quantidades, ao longo de um dia. Esse procedimento foi realizado por três dias não consecutivos, incluindo um dia de final de semana.

Variáveis de estilo de vida tais como: uso de suplementos vitamínicos, tabagismo (fumantes ou não-fumantes), número de cigarros por dia, prática regular de atividade física (sim ou não) e intensidade da atividade física também foram coletados. Para quantificar a intensidade de atividade física, foi utilizado o índice metabólico equivalente (MET). Este índice representa a razão entre a quantidade de energia (kcal) despendida para a realização de uma determinada atividade física e a energia equivalente à situação de repouso. Convencionalmente, considera-se que a situação de repouso refere-se ao MET = 1. As pontuações dos METs foram fornecidas pelo Compêndio de Atividades Físicas (Amorim and Gomes 2003), um esquema de codificação que classifica as atividades físicas de acordo com seu dispêndio energético em relação à situação de repouso (Ainsworth, Haskell et al. 1993; Ainsworth, Haskell et al. 2000). Os METs, para cada atividade específica, foram calculados multiplicando o tempo gasto em cada atividade pela sua pontuação de MET, procedendo-se ao somatório de todas as atividades realizadas ao longo de uma semana, obtendo-se um valor médio, expresso em horas por dia.

3.2.6. Análise estatística

Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. De acordo com a distribuição das variáveis, foi adotado o teste de *Student-t*, paramétrico, ou seu equivalente não paramétrico, o teste de *Mann-Whitney-U*, para a comparação entre os grupos categorizados pela mediana da distribuição da CAT do plasma. Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste de qui-quadrado- χ^2 .

Foi utilizada a correlação de *Spearman* para rastrear a associação entre a CAT do plasma e as demais variáveis de interesse. Modelos de regressão linear simples foram utilizados para identificar os fatores preditivos da CAT do plasma (variável dependente). Estes modelos foram previamente ajustados para as covariáveis sexo, idade, tabagismo e atividade física, quando estes fatores mostraram efeito significativo.

Os resultados foram apresentados como média \pm DP. O intervalo de confiança de 95% foi utilizado para descrever os valores do coeficiente de regressão linear (β) e o de regressão logística, odds ratio (OR). Foi considerado o nível de significância estatística de 5 % de probabilidade ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS sistema versão 8.0 para Windows, *SAS Institute Inc., Cary, NC 27513, E.U.A.* (SAS 2001).

3.3. Resultados

Os parâmetros antropométricos clínicos e bioquímicos (média \pm DP) categorizados pelo valor da mediana da CAT do plasma (1,60 mM) são apresentados na Tabela 2.1. Indivíduos cujos valores da CAT do plasma estavam acima da mediana demonstraram maiores níveis séricos de LDL-c, maior relação colesterol total/fração HDL-c (índice aterogênico) e maior concentração de selênio nas unhas. Nenhum outro parâmetro bioquímico ou clínico diferiu entre os dois grupos referentes à CAT do plasma ($\leq 1,60$ mM *versus* $> 1,60$ mM). Da mesma forma, não foram encontradas diferenças relacionadas às medidas antropométricas ou de composição corporal.

Na Tabela 2.2, são apresentadas as variáveis de estilo de vida e ingestão dietética diária, também categorizadas pelo valor mediano da CAT do plasma (1,60 mM para as variáveis de estilo de vida e 1,62 mM para a ingestão dietética diária). Os valores de ingestão diária de calorias e de macronutrientes, expressos por quilograma de peso corporal (kcal/kg de peso corporal e g/kg de peso corporal, respectivamente), foram menores entre os indivíduos que exibiram maiores valores de CAT do plasma. A ingestão diária absoluta (g) de carboidratos e de

lipídios, também foi menor entre os indivíduos que exibiram maior CAT do plasma. A mesma tendência ocorreu para a ingestão diária absoluta de calorias (kcal) e de proteínas (g), no entanto não houve significância estatística. Nenhuma variável de estilo de vida diferiu entre as duas categorias da CAT do plasma.

Os valores da CAT do plasma se correlacionaram positivamente aos níveis séricos de LDL-c, à razão entre colesterol total/fração HDL-c e às concentrações de selênio nas unhas. Os valores de ingestão diária de calorias e de macronutrientes, tanto absolutos como expressos por quilograma de peso corporal, seguiram tendências similares, ou seja, foram correlacionados negativamente à CAT do plasma, no entanto sem significância estatística (Tabela 2.3). Nenhuma correlação foi encontrada para as variáveis de estilo de vida, tais como, números de cigarros/dia ou gasto calórico da atividade física relacionado ao gasto energético de repouso (MET) (dados não apresentados em tabela).

Em análise de regressão linear simples, a ingestão diária de calorias (kcal/kg de peso corporal) e de carboidrato (g/kg de peso corporal), exerceram efeito preditivo negativo sobre a CAT do plasma. O decréscimo de 1 unidade na ingestão calórica (1 kcal/kg de peso corporal) e de carboidratos (1 g/kg de peso) esteve associado ao aumento de, respectivamente, 0,013 mM e 0,111 mM na CAT do plasma. Cabe ressaltar que 3,8% do aumento na CAT do plasma foi devido ao efeito da ingestão calórica, ao passo que 5% à ingestão de carboidratos. Nenhum dos outros fatores exerceu efeito preditivo sobre a CAT do plasma (Tabela 2.4).

Tabela 2.1: Parâmetros antropométricos, clínicos e bioquímicos (média ± DP) categorizados pelo valor da mediana (1,60 mM) da CAT

	CAT ≤ 1,60 mM (n=78)	CAT > 1,60 mM (n=78)	P
Idade (anos)	23,5 ± 3,5	22,8 ± 3,6	0,055
Peso Corporal (kg)	62,2 ± 11,4	62,7 ± 11,0	0,320
IMC (kg/m ²)	21,7 ± 2,9	22,3 ± 2,9	0,110
Circunferência da Cintura (cm) ¹	77,6 ± 8,6	78,8 ± 8,6	0,391
Circunferência do Quadril (cm) ¹	95,6 ± 7,6	95,5 ± 5,8	0,872
Relação Cintura/Quadril	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,124
PC Tricipital (mm) ¹	17,8 ± 6,4	18,8 ± 7,6	0,389
PC Bicipital (mm)	7,2 ± 3,8	7,5 ± 4,0	0,363
PC Suprailiac (mm)	17,5 ± 8,5	19,3 ± 9,8	0,151
PC Subscapular (mm)	17,2 ± 7,4	18,6 ± 7,7	0,088
Soma das 4 PC (mm)	59,8 ± 22,7	64,2 ± 26,4	0,180
Gordura Troncular (%) ¹	57,7 ± 6,5	59,0 ± 6,7	0,206
Gordura Total (%)	23,1 ± 6,7	24,3 ± 6,5	0,190
Massa de Gordura (kg)	14,4 ± 5,1	15,4 ± 5,5	0,184
Massa Livre de Gordura (kg)	47,8 ± 9,8	47,3 ± 10,3	0,388
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	11,0 ± 0,9	10,9 ± 0,9	0,471
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	7,4 ± 0,7	7,3 ± 0,7	0,213
Glicose (mg/dL)	91,4 ± 7,4	89,8 ± 6,0	0,112
Insulina (μU/mL) ^a	10,4 ± 5,8	10,1 ± 5,3	0,412
HOMA-IR ^a	2,3 ± 1,3	2,3 ± 1,3	0,338
Colesterol Total (mg/dL) ¹	156,6 ± 33,4	163,9 ± 29,3	0,151
HDL-c (mg/dL) ^b	47,4 ± 11,7	45,7 ± 11,1	0,189
^{s*} LDL-c (mg/dL)	91,1 ± 25,9	100,4 ± 27,1	0,012
Triacilgliceróis (mg/dL)	96,7 ± 36,9	103,4 ± 51,5	0,340
^{s**} Relação Colesterol Total/HDL-c ^b	3,4 ± 0,7	3,7 ± 0,9	0,006
Ácido Úrico (mg/dL) ¹	3,5 ± 1,1	3,6 ± 1,1	0,413
Ceruloplasmina (mg/dL)	37,2 ± 8,5	37,3 ± 8,4	0,336
^{s*} Selênio (ng/g de unha) ^c	372,8 ± 74,2	398,4 ± 92,4	0,040
Zinco (μg/g de unha) ^c	118,5 ± 27,5	140,0 ± 86,2	0,126
Cobre (μg/g de unha) ^c	7,0 ± 5,4	7,0 ± 3,9	0,124
Atividade da GPx (nmol/[mL/min]) ^d	608,3 ± 300,4	552,5 ± 262,5	0,237
LDLox (U/L) ^{1,e}	77,3 ± 30,1	70,5 ± 29,4	0,157

DP, desvio padrão; CAT, capacidade antioxidante total do plasma; IMC, índice de massa corporal; PC, prega cutânea; HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina; HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; GPx, glutathiona peroxidase; LDLox, lipoproteína de baixa densidade oxidada

¹ teste *Student t* foi realizado para as variáveis com distribuição normal, as demais variáveis foram analisadas pelo teste *Mann-Whitney U*

^a n=77 para CAT ≤ 1,60 mM; n=75 para CAT > 1,60 mM

^b n=76 para CAT ≤ 1,60 mM; n=73 para CAT > 1,60 mM

^c n=67 para CAT ≤ 1,60 mM; n=64 para CAT > 1,60 mM

^d n=54 para CAT ≤ 1,60 mM; n=43 para CAT > 1,60 mM

^e n=77 para CAT ≤ 1,60 mM

^{s*} diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05)

^{s**} diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade (P < 0,01)

Tabela 2.2: Variáveis de estilo de vida e ingestão dietética diária (média ± DP) categorizadas pelo valor da mediana (1,60 mM para variáveis de estilo de vida e 1,62 mM para ingestão dietética diária) da CAT

	CAT ≤ 1,60 mM (n=78)	CAT > 1,60 mM (n=78)	P
<i>Variáveis de Estilo de Vida</i>			
Uso de suplementação de vitaminas (%) ¹	5,2	7,7	0,711
Tabagismo (%) ^{1,a}	11,9	13,0	0,762
Prática regular de atividade física (%) ^{1,a}	71,6	73,9	0,901
Cigarros/dia ^a	1,6 ± 4,8	0,8 ± 2,7	0,484
MET (h/dia) ^a	30,3 ± 9,0	31,2 ± 10,0	0,232
	CAT ≤ 1,62 mM (n=66)	CAT > 1,62 mM (n=66)	P
<i>Ingestão Dietética Diária</i>			
Calorias (kcal) ²	2843,2 ± 748,8	2595,4 ± 742,4	0,058
^{s*} Carboidrato (g)	376,9 ± 114,1	332,5 ± 97,7	0,017
Proteína (g) ²	106,7 ± 34,5	99,1 ± 34,5	0,055
^{s*} Lipídio (g)	103,2 ± 33,7	90,5 ± 26,0	0,018
^{s*} Calorias (kcal/kg de peso corporal) ²	46,5 ± 12,5	41,7 ± 11,3	0,024
^{s**} Carboidrato (g/kg de peso corporal)	6,1 ± 1,7	5,3 ± 1,4	0,009
^{s*} Proteína (g/kg de peso corporal)	1,7 ± 0,5	1,5 ± 0,5	0,034
^{s*} Lipídio (g/kg de peso corporal)	1,6 ± 0,6	1,4 ± 0,4	0,013
Fibra (g)	27,5 ± 14,4	26,1 ± 16,3	0,160
Colesterol (g)	234,7 ± 103,2	209,9 ± 93,4	0,081
Ácidos graxos saturados (g)	23,4 ± 9,9	21,4 ± 9,4	0,143
Ácidos graxos monoinsaturados (g)	17,1 ± 11,2	16,0 ± 6,8	0,416
Ácidos graxos poliinsaturados (g)	14,7 ± 9,6	13,7 ± 7,5	0,264
Vitamina A (mg)	886,6 ± 507,6	921,7 ± 537,4	0,321
Vitamina C (mg)	136,5 ± 116,9	107,7 ± 64,0	0,083
Ferro (mg)	16,5 ± 6,5	19,6 ± 30,3	0,068
Cobre (mg)	1,2 ± 0,6	1,4 ± 1,5	0,252
Zinco (mg) ²	8,5 ± 3,8	8,1 ± 3,3	0,550

DP, desvio padrão; CAT, capacidade antioxidante total do plasma; MET, índice metabólico equivalente

¹ teste *qui-quadrado* χ^2 test para variáveis categóricas

² teste *Student t* foi realizado para as variáveis com distribuição normal, as demais variáveis foram analisadas pelo teste *Mann-Whitney U*

^a n=67 para CAT ≤ 1,60 mM; n=69 para CAT > 1,60 mM

^{s*} diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05)

^{s**} diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade (P < 0,01)

Tabela 2.3: Associação (coeficiente de correlação de Spearman: r) entre a CAT (mM) e os parâmetros antropométricos, clínicos, bioquímicos e ingestão dietética diária

	r	P
<i>Antropometria e Pressão Arterial (n=156)</i>		
Idade (anos)	-0,13	0,099
Peso Corporal (kg)	0,06	0,426
IMC (kg/m ²)	0,12	0,129
Circunferência da Cintura (cm)	0,06	0,482
Circunferência do Quadril (cm)	-0,01	0,926
Relação Cintura/Quadril	0,07	0,396
PC Tricipital (mm)	0,07	0,407
PC Bicipital (mm)	0,01	0,949
PC Supraílica (mm)	0,06	0,486
PC Subescapular (mm)	0,08	0,318
Soma das 4 PC (mm)	0,05	0,568
Gordura Troncular (%)	0,07	0,382
Gordura Total (%)	0,03	0,624
Massa de Gordura (kg)	0,05	0,509
Massa Livre de Gordura (kg)	0,01	0,863
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	0,06	0,428
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	0,04	0,575
<i>Parâmetros Bioquímicos (n=156)</i>		
Glicose (mg/dL)	-0,10	0,226
Insulina (μU/mL) ^a	-0,02	0,829
HOMA-IR ^a	-0,03	0,680
Colesterol Total (mg/dL)	0,08	0,307
HDL-c (mg/dL) ^b	-0,09	0,288
^{s*} LDL-c (mg/dL)	0,16	0,043
Triacilgliceróis (mg/dL)	0,02	0,787
^{s*} Relação Colesterol Total/HDL-c ^b	0,19	0,020
Ácido Úrico (mg/dL)	0,07	0,386
Ceruloplasmina (mg/dL)	0,01	0,870
^{s*} Selênio (ng/g de unha) ^c	0,21	0,015
Zinco (μg/g de unha) ^c	0,06	0,489
Cobre (μg/g de unha) ^c	0,13	0,137
Atividade da GPx (nmol/[mL/min]) ^d	-0,07	0,486
LDLox (U/L) ^e	-0,11	0,159
<i>Ingestão Dietética Diária (n=132)</i>		
Calorias (kcal)	-0,11	0,214
Carboidrato (g)	-0,12	0,165
Proteína (g)	-0,11	0,214
Lipídio (g)	-0,09	0,314
Calorias (kcal/kg de peso corporal)	-0,16	0,058
Carboidrato (g/kg de peso corporal)	-0,17	0,051
Proteína (g/kg de peso corporal)	-0,17	0,050
Lipídio (g/kg de peso corporal)	-0,15	0,071
Fibra (g)	-0,01	0,895
Colesterol (g)	-0,11	0,211
Ácidos graxos saturados (g)	-0,09	0,276
Ácidos graxos monoinsaturados (g)	0,04	0,607
Ácidos graxos poliinsaturados (g)	0,03	0,694
Vitamina A (mg)	0,13	0,137
Vitamina C (mg)	-0,09	0,305
Ferro (mg)	-0,04	0,670
Cobre (mg)	0,03	0,683
Zinco (mg)	-0,01	0,985

CAT, capacidade antioxidante total do plasma; IMC, índice de massa corporal; PC, prega cutânea; HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina; HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; GPx, glutatona peroxidase; LDLox, lipoproteína de baixa densidade oxidada

^an=152; ^bn=149; ^cn=131; ^dn=97; ^en=155

^{s*} diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05)

Tabela 2.4: Preditores da CAT (mM): regressão linear simples (n=156)

Preditores da CAT	coeficiente β (IC 95%)	P	r^2
LDL-c (mg/dL)	0,002 (-0,003 a 0,007)	0,427	0,004
Relação Colesterol Total/HDL-c ¹	0,158 (-0,028 a 0,345)	0,096	0,018
Selênio (ng/g de unha) ²	0,001 (-0,001 a 0,003)	0,117	0,018
Carboidrato (g/dia) ³	-0,001 (-0,002 a 0,893)	0,053	0,028
Lipídio (g/dia) ³	-0,003 (-0,008 a 0,001)	0,136	0,017
^{s*} Ingestão Calórica Diária (kcal/kg de peso corporal) ³	-0,013 (-0,024 a -0,001)	0,025	0,038
^{s**} Ingestão Diária Carboidrato (g/kg de peso corporal) ³	-0,111 (-0,195 a -0,027)	0,009	0,050
Ingestão Diária Proteína (g/kg de peso corporal) ³	-0,257 (-0,514 a -0,000)	0,050	0,029
Ingestão Diária Lipídio (g/kg de peso corporal) ³	-0,238 (-0,500 a 0,033)	0,073	0,024

CAT, capacidade antioxidante total do plasma; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; HDL-c, lipoproteína de alta densidade

¹n=149, ²n=131, ³n=132

^{s*} diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$)

^{s**} diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade ($P < 0,01$)

3.4. Discussão

A CAT diz respeito à habilidade de todos os antioxidantes presentes em um fluido biológico, usualmente o plasma, em prevenir a oxidação de um substrato por um oxidante, ou ainda, induzir a redução desse substrato (Blauz, Pilaszek et al. 2008). Existem diferentes métodos de aferição de tal biomarcador, entre eles: *Ferric Reducing Ability of Plasma* – FRAP (Benzie and Strain 1996), *Total Peroxyl Radical-Trapping Potential* (TRAP) (Pellegrini, Riso et al. 2000; Serafini, Laranjinha et al. 2000; Crews, Alink et al. 2001); *Oxygen-Radical Absorbance Capacity* – ORAC e *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* – TEAC (Crews, Alink et al. 2001). Devido à existência de diferentes métodos de aferição, decorre uma ampla variabilidade de resultados, cuja interpretação deve ser cautelosa (Kampa, Nistikaki et al. 2002). Tais ensaios diferem em relação ao substrato e oxidantes utilizados, bem como em relação ao método de dosagem: fluorimétrico, colorimétrico e quimioluminescência, entre outros (Crews, Alink et al. 2001).

A utilização da CAT do plasma como biomarcador do estresse oxidativo se baseia no pressuposto da existência da ação sinérgica entre os vários compostos antioxidantes presentes na amostra, sendo que a soma da atividade de todos estes compostos (antioxidantes endógenos e dietéticos) tem maior capacidade preditiva e relevância biológica quando comparada à atividade de um único, uma vez que considera a cooperação e a interação existente entre os vários compostos antioxidantes na proteção contra os danos oxidativos (Crews, Alink et al. 2001; Kampa, Nistikaki et al. 2002; Blauz, Pilaszek et al. 2008). No entanto, Kampa, Nistikaki et al. (2002) sugeriram que em condições fisiológicas, grande parte da CAT é devida à atividade de

componentes endógenos (cerca de 85%), em detrimento da participação dos antioxidantes dietéticos. Outros autores confirmam a relevante participação dos antioxidantes endógenos na CAT de fluidos biológicos (Wayner, Burton et al. 1987; Landray, Nuttall et al. 1998; Crews, Alink et al. 2001; Koracevic, Koracevic et al. 2001; Young 2001). No presente estudo não foram evidenciados efeitos dos antioxidantes endógenos, como ácido úrico, ceruloplasmina e atividade enzimática da glutathione peroxidase sobre a CAT do plasma.

As maiores concentrações de selênio estiveram presentes nas unhas daqueles indivíduos cujos valores da CAT do plasma estavam acima da mediana. A atividade antioxidante do selênio é em parte, devida à sua participação com cofator enzimático da glutathione peroxidase, inserido no seu centro catalítico ligado covalentemente a um resíduo de cisteína, constituindo-se em selenocisteína (Steinbrenner and Sies 2009). O estado nutricional desse mineral antioxidante pode ser aferido por meio da sua dosagem no soro, plasma, eritrócitos, plaquetas ou ainda no sangue total (Al-Saleh and Billedo 2006). No presente estudo procedeu-se à sua dosagem nas unhas, marcador capaz de refletir o estado nutricional do mineral em longo prazo, 6 a 18 meses precedentes (Hunter, Morris et al. 1990; Al-Saleh and Billedo 2006), ao passo que sua dosagem sanguínea se limita a refletir seu estado nutricional em curto prazo, referente a ingestão dietética de algumas semanas precedentes (Longnecker, Stampfer et al. 1993). O fato da dosagem de selênio nas unhas se constituir em um indicador de sua ingestão dietética habitual pode ter sido determinante da associação positiva observada entre a concentração deste mineral nas unhas e a CAT do plasma.

No presente estudo, os antioxidantes dietéticos, sobretudo as vitaminas e os minerais, como ocorreu para os componentes endógenos, não exerceram efeito sobre a CAT do plasma. Tal resultado encontra respaldo na pequena participação dos componentes dietéticos na CAT do plasma, cerca de 15%, segundo Kampa, Nistikaki et al. (2002). O fato da inabilidade dos antioxidantes dietéticos em aumentar a CAT do plasma, corrobora os achados do presente estudo. Alguns estudos demonstraram que a suplementação de vitaminas e minerais antioxidantes não foi capaz de aumentar a CAT de fluidos biológicos, mesmo diante do aumento dos níveis plasmáticos ou séricos desses compostos (Steinberg and Chait 1998; van het Hof, Tijburg et al. 1998; Huang, Appel et al. 2002; Dunstan, Breckler et al. 2007). Resultados semelhantes ocorreram em relação à administração de alimentos ou bebidas (vinho tinto, azeite de oliva e tomate) fontes de compostos antioxidantes (Pellegrini, Riso et al. 2000; Visioli, Riso et al. 2003;

Tyssandier, Feillet-Coudray et al. 2004; Fito, Cladellas et al. 2005; Salvini, Sera et al. 2006; Karlsen, Retterstol et al. 2007).

Por outro lado, Pitsavos, Panagiotakos et al. (2005) conseguiram evidenciar que a maior adesão à dieta mediterrânea foi capaz de aumentar, em até 6%, a CAT. Leighton, Cuevas et al. (1999) corroboraram a afirmativa de que a maior adesão ao padrão dietético mediterrâneo determina o aumento da CAT. A interação e o sinergismo entre os vários nutrientes e alimentos com propriedade antioxidante são, potencialmente, determinantes do efeito benéfico da dieta mediterrânea sobre a CAT (Stachowska, Wesolowska et al. 2005; Seyedrezazadeh, Ostadrahimi et al. 2008). Além do marcante consumo de frutas, hortaliças, cereais integrais e peixes (Trichopoulou, Costacou et al. 2003), o padrão dietético mediterrâneo tem como gordura principal o azeite de oliva, fonte dos fenóis simples: tirosol e hidrotirosol, compostos potencialmente antioxidantes (Fito, de la Torre et al. 2007). A presença freqüente do vinho tinto, fonte considerável de compostos fenólicos, entre eles: resveratrol, quercetinas, catequinas, ácidos fenólicos e outros, também adiciona atividade antioxidante ao referido padrão dietético (Pignatelli, Ghiselli et al. 2006).

Ainda em relação à ingestão dietética, a restrição calórica se constitui em padrão dietético, também associado à modulação do estresse oxidativo. Estudos de intervenção evidenciaram efeitos positivos da restrição calórica sobre alguns biomarcadores de interesse, entre eles os baseados na oxidação de lipídios: *Thiobarbituric Reactive Acid Substances* – TBARS (Dandona, Mohanty et al. 2001), *Malondialdehyde* - MDA (Mohn, Catino et al. 2005; Skrha, Kunesova et al. 2005; Crujeiras, Parra et al. 2006; Crujeiras, Parra et al. 2007) e isoprostanos (Crujeiras, Parra et al. 2007; Johnson, Summer et al. 2007); de DNA: *8-Hidroxy-2'-Deoxyguanosine* - 8-OHdG (Saiki, Nagayama et al. 2005) e de proteínas: grupos carbonila e nitrotirosina (Johnson, Summer et al. 2007). A restrição calórica ainda exerce efeito sobre alguns biomarcadores do sistema de defesa antioxidante, entre eles: a atividade enzimática da superóxido dismutase e os níveis plasmáticos de ácido ascórbico (Skrha, Kunesova et al. 2005). O efeito protetor da restrição calórica sobre a instalação do estresse oxidativo vem sendo atribuído, principalmente, à redução do peso corporal (Skrha, Kunesova et al. 2005; Vincent, Innes et al. 2007). No entanto, o presente estudo foi capaz de demonstrar que em indivíduos saudáveis e predominantemente eutróficos ($IMC \leq 25 \text{ kg/m}^2$; 84%), segundo pontos de corte preconizados pela Organização Mundial de Saúde (WHO 1998), a ingestão calórica e de macronutrientes, depois de normalizadas por

quilograma de peso corporal, foi menor entre aqueles indivíduos com maior CAT do plasma. Ainda pela análise de regressão, demonstrou-se que o decréscimo na ingestão diária de calorias (kcal/kg de peso corporal) e de carboidratos (g/kg peso corporal) esteve associado ao aumento da CAT do plasma.

A energia química contida nos carboidratos, lipídios e proteínas é liberada pela oxidação desses substratos e armazenada nas ligações de fosfato do *adenosine triphosphate* (ATP), produto final da cadeia transportadora de elétrons (CTE), tendo o oxigênio comoceptor final. Durante o transporte de elétrons pode haver redução parcial do oxigênio com a formação do radical ânion superóxido, sendo assim, a CTE constitui uma das principais vias metabólicas de geração deste radical livre (Boveris, Fraga et al. 1983; Mueller, Laude et al. 2005). Este radical é o iniciador da cascata de reações de óxido-redução, cuja propagação e amplificação podem culminar na instalação do estresse oxidativo (Schneider and Oliveira 2004). Partindo de tais pressupostos, a associação negativa entre a CAT e a ingestão calórica poderia ser explicada pela menor geração de radicais ânion superóxido, decorrente da menor disponibilidade de substratos oxidáveis, havendo menor requerimento da atuação dos sistemas de defesa enzimática e, por conseguinte preservando uma maior CAT do plasma.

A menor geração de radicais livres e espécies reativas de oxigênio destaca-se como uma das hipóteses propostas para explicar o efeito da restrição calórica sobre o aumento da longevidade (Masoro 2005). Em estudo de revisão, Genaro Pde, Sarkis et al. (2009) apontaram que os mecanismos moleculares vêm sendo continuamente estudados, no entanto ainda não estão estabelecidos. Segundo Farinatti (2002), o metabolismo energético gera espécies reativas de oxigênio, sugerindo que este poderia ser um possível mecanismo bioquímico. Este autor ainda ressalta que o efeito protetor da restrição calórica pode ser independente da menor taxa metabólica basal dela decorrente, uma vez que embora a taxa de consumo de oxigênio permaneça inalterada, o nível de oxidação molecular pode variar em função das frações do oxigênio metabolizado que serão convertidos em espécies reativas. Em condições fisiológicas, aproximadamente, 85 a 90% do oxigênio consumido é metabolizado na cadeia transportadora de elétrons, sendo que ao final, o oxigênio sofre redução tetravalente gerando água. No entanto, em razão de sua configuração eletrônica, o oxigênio pode sofrer redução univalente e gerar o radical superóxido. Estima-se que aproximadamente, 2 a 5% do oxigênio metabolizado na mitocôndria

são reduzidos incompletamente (redução univalente), gerando radical ânion superóxido (Schneider and Oliveira 2004).

O aumento da CAT do plasma pode se constituir em mecanismo compensatório frente a condições oxidantes (Kampa, Nistikaki et al. 2002). A fração LDL-c é o substrato para a reação de oxidação, mediada pela substituição do resíduo 60 de lisina da apolipoproteína B100, que resulta na geração da LDLox (Holvoet, Vanhaecke et al. 1998; Holvoet, Mertens et al. 2001; Holvoet 2006). Cabe ressaltar que a relação colesterol total/fração HDL-c, foi apontada por Castelli (1988), com base nos dados do *Framingham Heart Study*, como índice aterogênico, fator potencialmente preditivo de doença coronariana arterial. O processo aterosclerótico está intimamente associado à instalação do estresse oxidativo (Katakami, Sakamoto et al. 2009). Diante desses pressupostos é possível justificar o fato de que no presente estudo, a maior CAT do plasma esteve associada a condições oxidantes, como, maiores níveis circulantes de LDLox e maior relação colesterol total/HDL-c. Por outro lado, o aumento substancial de radicais livres, decorrentes de processos patológicos, ultrapassa a capacidade do aumento compensativo das defesas antioxidantes. Os achados de Demirbag, Yilmaz et al. (2005) e Kurban, Mehmetoglu et al. (2008) corroboram esse pressuposto, demonstrando que diante de condições patológicas associadas ao estresse oxidativo, torna-se inviável o aumento da CAT como mecanismo compensatório. É importante destacar que o presente estudo, foi conduzido com indivíduos jovens, aparentemente saudáveis, sem nenhuma condição fisiopatológica associada ao estresse oxidativo e, segundo os pontos de corte da IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemia e Prevenção de Aterosclerose (SBC 2007), predominantemente, normolipidêmicos (colesterol total < 200 mg/dL; 92,3% e LDL-c < 160 mg/dL; 97,4%). Sendo assim, é viável considerar o aumento da CAT do plasma como mecanismo compensatório, cuja atuação tem o objetivo de restabelecer o equilíbrio homeostático.

Quando a geração de espécies reativas de oxigênio supera os sistemas de defesa antioxidante evidencia-se o estado de estresse oxidativo (Halliwell and Whiteman 2004), cuja cronicidade tem relevantes implicações sobre uma série de condições patológicas, entre elas a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (Furukawa, Fujita et al. 2004; Galili, Versari et al. 2007; Roberts and Sindhu 2009). Em condições fisiológicas, o sistema biológico lança mão de mecanismos de regulação, com o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência dos danos oxidativos. Essa

regulação consiste em mecanismos de *feedback negativo*, por meio dos quais o sistema biológico ativa vias de expressão gênica e ativação enzimática, no sentido de restaurar o equilíbrio homeostático (Halliwell and Whiteman 2004; Hicks, Torres-Ramos et al. 2006). Dependendo da intensidade das condições oxidantes pré-existentes, os danos oxidativo são incontrolláveis. Estes decorrem de uma cascata de reações de óxido-redução, com a consequente liberação de uma segunda geração de produtos da oxidação, moléculas também potencialmente reativas (Hicks, Torres-Ramos et al. 2006). A amplificação e propagação das espécies reativas culminam em danos oxidativos a biomoléculas, resultando em alterações da estrutura e da função biológica das proteínas, efeitos deletérios ao DNA e peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, componentes das membranas celulares, com diminuição da sua capacidade de fluidez, redução do potencial eletroquímico e aumento da permeabilidade seletiva (Luczaj and Skrzydlewska 2003; Roberts and Sindhu 2009). Por conseguinte, instaura-se o desequilíbrio homeostático irreversível, cuja manifestação é o dano potencial às células e/ou tecidos, seguido de morte celular por necrose ou apoptose (Halliwell and Whiteman 2004; Hicks, Torres-Ramos et al. 2006).

A obesidade, sobretudo o acúmulo de gordura visceral, vem sendo associada ao estresse oxidativo (Roberts and Sindhu 2009). Furukawa, Fujita et al. (2004) evidenciaram que a circunferência da cintura, quando comparada ao índice de massa corporal, mostrou-se mais fortemente correlacionada aos biomarcadores decorrentes da maior peroxidação lipídica: TBARS e PGF2-alfa-8-isoprostano. Chrysohoou, Panagiotakos et al. (2007) confirmaram que o acúmulo de gordura visceral, medido indiretamente pela circunferência da cintura maior que 88 cm (em mulheres) e 102 cm (em homens), esteve associado a menores valores de CAT. A ação do estresse oxidativo sobre o tecido adiposo visceral resulta no aumento da expressão de adipocinas, sinalização inflamatória e indução da resistência à insulina, fatores que predisõem à geração de espécies reativas de oxigênio e consequente instalação do estresse oxidativo (Furukawa, Fujita et al. 2004; Roberts and Sindhu 2009). No presente estudo, a pequena frequência de indivíduos obesos (IMC ≥ 30 Kg/m²; 1,3%) (WHO 1998), e apresentando valores de circunferência da cintura elevados (102 cm para homens e 88 para mulheres; 4,8%) (NCEP-ATPIII. 2001), pode ter sido determinante da ausência de associações entre a CAT do plasma e estes parâmetros antropométricos, além de outras medidas de adiposidade, como, pregas cutâneas, percentual de gordura corporal e massa de gordura corporal.

Em indivíduos jovens e aparentemente saudáveis, a CAT do plasma não esteve associada a parâmetros antropométricos, nem tampouco aos demais biomarcadores do estresse oxidativo (atividade da GPx e concentrações plasmáticas de LDL oxidada). No entanto, a redução da ingestão diária de calorias (kcal/kg de peso corporal) e de carboidratos (g/kg de peso corporal) conseguiu prever o aumento da CAT do plasma. Assim, o nível de ingestão calórica é o primeiro fator a atuar na modulação da CAT do plasma, antes de se estabelecer desvios antropométricos, de composição corporal e/ou metabólicos. Em condições fisiológicas, o aumento da CAT do plasma foi capaz de atuar como mecanismo compensatório frente a condições oxidantes. A CAT é um biomarcador de grande relevância biológica, pois considera a totalidade dos componentes envolvidos no sistema de defesa antioxidante (fatores endógenos e dietéticos).

3.5. Referências bibliográficas

- Ainsworth, B. E., W. L. Haskell, et al. (1993). "Compendium of physical activities: classification of energy costs of human physical activities." *Med Sci Sports Exerc* **25**(1): 71-80.
- Ainsworth, B. E., W. L. Haskell, et al. (2000). "Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities." *Med Sci Sports Exerc* **32**(9 Suppl): S498-504.
- Al-Saleh, I. and G. Billedo (2006). "Determination of selenium concentration in serum and toenail as an indicator of selenium status." *Bull Environ Contam Toxicol* **77**(2): 155-63.
- Amorim, P. R. and T. N. P. Gomes (2003). Métodos de baixo custo e aplicáveis na prática. *Gasto energético na atividade física*. P. R. Amorim and T. N. P. Gomes. Rio de Janeiro, Shape: 113 - 194.
- Bartosz, G. (2003). "Total antioxidant capacity." *Adv Clin Chem* **37**: 219-92.
- Benzie, I. F. and J. J. Strain (1996). "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay." *Anal Biochem* **239**(1): 70-6.
- Blauz, A., T. Pilaszek, et al. (2008). "Interaction between antioxidants in assays of total antioxidant capacity." *Food Chem Toxicol* **46**(7): 2365-8.
- Boveris, A., C. G. Fraga, et al. (1983). "Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats." *Arch Biochem Biophys* **227**(2): 534-41.
- Castelli, W. P. (1988). "Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease--the Framingham Heart Study." *Can J Cardiol* **4 Suppl A**: 5A-10A.

- Chrysohoou, C., D. B. Panagiotakos, et al. (2007). "The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: the ATTICA study." Nutr Metab Cardiovasc Dis **17**(8): 590-7.
- Crews, H., G. Alink, et al. (2001). "A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake." Br J Nutr **86 Suppl 1**: S5-35.
- Crujeiras, A. B., D. Parra, et al. (2007). "A hypocaloric diet enriched in legumes specifically mitigates lipid peroxidation in obese subjects." Free Radic Res **41**(4): 498-506.
- Crujeiras, A. B., M. D. Parra, et al. (2006). "A role for fruit content in energy-restricted diets in improving antioxidant status in obese women during weight loss." Nutrition **22**(6): 593-9.
- Dandona, P., P. Mohanty, et al. (2001). "The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation." J Clin Endocrinol Metab **86**(1): 355-62.
- Demirbag, R., R. Yilmaz, et al. (2005). "Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease." Mutat Res **570**(2): 197-203.
- Despres, J. P. and I. Lemieux (2006). "Abdominal obesity and metabolic syndrome." Nature **444**(7121): 881-7.
- DietPRO (2009). DietPRO, AS sistemas, versão 5.0. Viçosa.
- Duarte, T. L. and G. D. Jones (2007). "Vitamin C modulation of H₂O₂-induced damage and iron homeostasis in human cells." Free Radic Biol Med **43**(8): 1165-75.
- Dunstan, J. A., L. Breckler, et al. (2007). "Supplementation with vitamins C, E, beta-carotene and selenium has no effect on anti-oxidant status and immune responses in allergic adults: a randomized controlled trial." Clin Exp Allergy **37**(2): 180-7.
- Durnin, J. V. and J. Womersley (1974). "Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years." Br J Nutr **32**(1): 77-97.
- Farinatti, P. T. V. (2002). "Biological theories of aging: genetic and stochastic approaches." Rev Bras Med Esporte **8**(4): 129-138.
- Fito, M., M. Cladellas, et al. (2005). "Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial." Atherosclerosis **181**(1): 149-58.

- Fito, M., R. de la Torre, et al. (2007). "Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review." Ann Ist Super Sanita **43**(4): 375-81.
- Friedewald, W. T., R. I. Levy, et al. (1972). "Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge." Clin Chem **18**(6): 499-502.
- Furukawa, S., T. Fujita, et al. (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." J Clin Invest **114**(12): 1752-61.
- Galili, O., D. Versari, et al. (2007). "Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(2): H904-11.
- Genaro Pde, S., K. S. Sarkis, et al. (2009). "[Effect of caloric restriction on longevity]." Arq Bras Endocrinol Metabol **53**(5): 667-72.
- Ghiselli, A., M. Serafini, et al. (2000). "Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data." Free Radic Biol Med **29**(11): 1106-14.
- Gutteridge, J. M. (1994). "Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection." Chem Biol Interact **91**(2-3): 133-40.
- Halliwell, B. (1997). "Antioxidants and human disease: a general introduction." Nutr Rev **55**(1 Pt 2): S44-9; discussion S49-52.
- Halliwell, B. and M. Whiteman (2004). "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?" Br J Pharmacol **142**(2): 231-55.
- Hicks, J. J., Y. D. Torres-Ramos, et al. (2006). "Estrés oxidante. Concepto y clasificación." Revista de Endocrinología y Nutrición **14**(4): 223-226.
- Holvoet, P. (2006). "Obesity, the metabolic syndrome, and oxidized LDL." Am J Clin Nutr **83**(6): 1438; author reply 1438-9.
- Holvoet, P., A. Mertens, et al. (2001). "Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(5): 844-8.
- Holvoet, P., J. Vanhaecke, et al. (1998). "Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease." Circulation **98**(15): 1487-94.

- Huang, H. Y., L. J. Appel, et al. (2002). "Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial." Am J Clin Nutr **76**(3): 549-55.
- Hunter, D. J., J. S. Morris, et al. (1990). "Predictors of selenium concentration in human toenails." Am J Epidemiol **132**(1): 114-22.
- Johnson, J. B., W. Summer, et al. (2007). "Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma." Free Radic Biol Med **42**(5): 665-74.
- Kampa, M., A. Nistikaki, et al. (2002). "A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay." BMC Clin Pathol **2**(1): 3.
- Karlsen, A., L. Retterstol, et al. (2007). "Effects of a daily intake of one glass of red wine on biomarkers of antioxidante status, oxidative stress and inflammation in healthy adults." e-SPEN **2**: 127-33.
- Katakami, N., K. Sakamoto, et al. (2009). "Combined effect of oxidative stress-related gene polymorphisms on atherosclerosis." Biochem Biophys Res Commun **379**(4): 861-5.
- Koracevic, D., G. Koracevic, et al. (2001). "Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids." J Clin Pathol **54**(5): 356-61.
- Kurban, S., I. Mehmetoglu, et al. (2008). "Homocysteine levels and total antioxidant capacity in children with acute rheumatic fever." Clin Biochem **41**(1-2): 26-9.
- Landray, M. J., S. L. Nuttall, et al. (1998). "Total antioxidant capacity by enhanced chemiluminescence: contribution of urate." Ann Clin Biochem **35** (Pt 4): 553-4.
- Leighton, F., A. Cuevas, et al. (1999). "Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans." Drugs Exp Clin Res **25**(2-3): 133-41.
- Longnecker, M. P., M. J. Stampfer, et al. (1993). "A 1-y trial of the effect of high-selenium bread on selenium concentrations in blood and toenails." Am J Clin Nutr **57**(3): 408-13.
- Luczaj, W. and E. Skrzydlewska (2003). "DNA damage caused by lipid peroxidation products." Cell Mol Biol Lett **8**(2): 391-413.
- Masoro, E. J. (2005). "Overview of caloric restriction and ageing." Mech Ageing Dev **126**(9): 913-22.

- Matthews, D. R., J. P. Hosker, et al. (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." Diabetologia **28**(7): 412-9.
- Mohn, A., M. Catino, et al. (2005). "Increased oxidative stress in prepubertal severely obese children: effect of a dietary restriction-weight loss program." J Clin Endocrinol Metab **90**(5): 2653-8.
- Mueller, C. F., K. Laude, et al. (2005). "ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(2): 274-8.
- Navarro-Blasco, I. and J. I. Alvarez-Galindo (2004). "Selenium content of Spanish infant formulae and human milk: influence of protein matrix, interactions with other trace elements and estimation of dietary intake by infants." J Trace Elem Med Biol **17**(4): 277-89.
- NCEP-ATPIII. (2001). "Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)." Jama **285**(19): 2486-97.
- Opara, E. C., E. Abdel-Rahman, et al. (1999). "Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes." Metabolism **48**(11): 1414-7.
- Ozkan, Y., S. Yardim-Akaydin, et al. (2006). "Increased plasma homocysteine and allantoin levels in coronary artery disease: possible link between homocysteine and uric acid oxidation." Acta Cardiol **61**(4): 432-9.
- Pellegrini, N., P. Riso, et al. (2000). "Tomato consumption does not affect the total antioxidant capacity of plasma." Nutrition **16**(4): 268-71.
- Perloff, D., C. Grim, et al. (1993). "Human blood pressure determination by sphygmomanometry." Circulation **88**(5 Pt 1): 2460-70.
- Pignatelli, P., A. Ghiselli, et al. (2006). "Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine." Atherosclerosis **188**(1): 77-83.
- Pitsavos, C., D. B. Panagiotakos, et al. (2005). "Adherence to the Mediterranean diet is associated with total antioxidant capacity in healthy adults: the ATTICA study." Am J Clin Nutr **82**(3): 694-9.
- Roberts, C. K. and K. K. Sindhu (2009). "Oxidative stress and metabolic syndrome." Life Sci **84**(21-22): 705-12.

- Saiki, A., D. Nagayama, et al. (2005). "Effect of weight loss using formula diet on renal function in obese patients with diabetic nephropathy." Int J Obes (Lond) **29**(9): 1115-20.
- Salas-Salvado, J., M. A. Rubio, et al. (2007). "[SEEDO 2007 Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria]." Med Clin (Barc) **128**(5): 184-96; quiz 1 p following 200.
- Salvini, S., F. Sera, et al. (2006). "Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women." Br J Nutr **95**(4): 742-51.
- SAS (2001). SAS Institute Inc., User's guide, version 8.0 (licenciado pela UFV). Cary, NC 27513, E.U.A.
- SBC (2007). "Sociedade Brasileira de Cardiologia, IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção de aterosclerose." Arquivos Brasileiros de Cardiologia **88**(suppl. 1): doi: 10.1590/S0066-782X2007000700002
- Schneider, C. D. and A. R. Oliveira (2004). "Radicales libres de oxígeno y ejercicio: mecanismos de formación y adaptación al entrenamiento." Rev Bras Med Esporte **10**(4): 308-313.
- Serafini, M. and D. Del Rio (2004). "Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool?" Redox Rep **9**(3): 145-52.
- Serafini, M., J. A. Laranjinha, et al. (2000). "Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans." J Nutr Biochem **11**(11-12): 585-590.
- Seyedrezazadeh, E., A. Ostadrahimi, et al. (2008). "Effect of vitamin E and selenium supplementation on oxidative stress status in pulmonary tuberculosis patients." Respirology **13**(2): 294-8.
- Skrha, J., M. Kunesova, et al. (2005). "Short-term very low calorie diet reduces oxidative stress in obese type 2 diabetic patients." Physiol Res **54**(1): 33-9.
- Stachowska, E., T. Wesolowska, et al. (2005). "Elements of Mediterranean diet improve oxidative status in blood of kidney graft recipients." Br J Nutr **93**(3): 345-52.
- Steinberg, F. M. and A. Chait (1998). "Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers." Am J Clin Nutr **68**(2): 319-27.
- Steinbrenner, H. and H. Sies (2009). "Protection against reactive oxygen species by selenoproteins." Biochimica et Biophysica Acta doi: **10.1016/j.bbagen.2009.02.014**.

- Terao, J., M. Piskula, et al. (1994). "Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers." Arch Biochem Biophys **308**(1): 278-84.
- Tremblay, A. J., H. Morrisette, et al. (2004). "Validation of the Friedewald formula for the determination of low-density lipoprotein cholesterol compared with beta-quantification in a large population." Clin Biochem **37**(9): 785-90.
- Trichopoulou, A., T. Costacou, et al. (2003). "Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population." N Engl J Med **348**(26): 2599-608.
- Tyssandier, V., C. Feillet-Coudray, et al. (2004). "Effect of tomato product consumption on the plasma status of antioxidant microconstituents and on the plasma total antioxidant capacity in healthy subjects." J Am Coll Nutr **23**(2): 148-56.
- van het Hof, K. H., L. B. Tijburg, et al. (1998). "Antioxidant fortified margarine increases the antioxidant status." Eur J Clin Nutr **52**(4): 292-9.
- Vincent, H. K., K. E. Innes, et al. (2007). "Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity." Diabetes Obes Metab **9**(6): 813-39.
- Visioli, F., P. Riso, et al. (2003). "Protective activity of tomato products on in vivo markers of lipid oxidation." Eur J Nutr **42**(4): 201-6.
- Warnberg, J., E. Nova, et al. (2006). "Inflammatory proteins are related to total and abdominal adiposity in a healthy adolescent population: the AVENA Study." Am J Clin Nutr **84**(3): 505-12.
- Wayner, D. D., G. W. Burton, et al. (1987). "The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma." Biochim Biophys Acta **924**(3): 408-19.
- WHO (1998). "World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic." WHO Technical Report Series 894.
- Young, I. S. (2001). "Measurement of total antioxidant capacity." J Clin Pathol **54**(5): 339.

4. CAPÍTULO 3

Preditores da atividade eritrocitária de glutatona peroxidase em adultos jovens saudáveis

4.1. Introdução

A glutatona peroxidase (GPx) integra o sistema enzimático de defesa antioxidante. O adequado funcionamento desse sistema requer a ação integrada entre várias enzimas. A atividade enzimática GPx é dependente de selênio, e constitui um dos principais meios de controle dos níveis de peróxido de hidrogênio (Bolzan, Bianchi et al. 1997; Ferreira and Matsubara 1997; Steinbrenner and Sies 2009). Essa espécie reativa, por meio das reações de *Fenton* e *Haber-Weiss*, dá origem a hidroxila, radical livre contra o qual não há defesa enzimática específica e cujo potencial deletério resulta na iniciação do processo de peroxidação lipídica das membranas celulares (Yu 1994; Ferreira and Matsubara 1997; Welch, Davis et al. 2002; Salvi, Battaglia et al. 2007). Assim, o acúmulo de peróxido de hidrogênio é extremamente lesivo ao sistema biológico e deve ser evitado. A GPx, além da catalase, tem como substrato o peróxido de hidrogênio e age com o propósito de controlar seus níveis, impedindo seu acúmulo e a conseqüente geração da hidroxila. A atividade enzimática da GPx, tem importância ressaltada, pois demonstra maior afinidade pelo peróxido de hidrogênio (menor valor de K_m) (Little, Olinescu et al. 1970). A GPx catalisa ainda a redução de peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis (Shan, Aw et al. 1990; Andersen, Nielsen et al. 1997).

A ação da GPx na redução dos peróxidos de hidrogênio e orgânicos ocorre às custas da conversão da glutatona reduzida em oxidada (Shan, Aw et al. 1990; Andersen, Nielsen et al. 1997; Ferreira and Matsubara 1997). Neste contexto, a GPx também merece atenção especial, uma vez que sua atividade depende do ciclo redox da glutatona, controlado pela inter-conversão entre glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), decorrente da ação de outras duas enzimas (glutatona redutase e glutatona oxidase) e de seus substratos (NADPH e peróxido de hidrogênio) (Ferreira and Matsubara 1997).

A atividade eritrocitária da GPx consiste em um importante marcador da capacidade do sistema antioxidante enzimático, cuja atuação integrada e sinérgica, determina a eliminação de espécies reativas de oxigênio, bem como, o controle ou reparo dos danos oxidativos decorrentes (Shan, Aw et al. 1990; Halliwell and Whiteman 2004; Schneider and Oliveira 2004). Estes danos vêm sendo continuamente associados à etiopatogenia de processos associados à síndrome

metabólica. Estes processos são decorrentes de alterações metabólicas que incluem, principalmente, acúmulo de adiposidade visceral, resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia e hipertensão arterial, que em conjunto caracterizam a síndrome metabólica (Furukawa, Fujita et al. 2004; Galili, Versari et al. 2007; Roberts and Sindhu 2009).

Estudos apontam que a atividade eritrocitária de enzimas antioxidantes, sobretudo a atividade da GPx, é modulada por fatores associados ao estilo de vida como: tabagismo e consumo de suplementos vitamínicos e minerais, além de variáveis como sexo e idade (Jozwiak and Jasnowska 1985; Guemouri, Artur et al. 1991; Ceballos-Picot, Trivier et al. 1992; Andersen, Nielsen et al. 1997; Bolzan, Bianchi et al. 1997; Pavao, Cordeiro et al. 2003).

O conhecimento das associações entre a atividade eritrocitária da GPx e os fatores determinantes da síndrome metabólica em indivíduos jovens e saudáveis, permitirá o melhor entendimento do papel da GPx, como indicador precoce de processos fisiopatológicos, predisponentes à instalação da síndrome metabólica, auxiliando na implementação de medidas de intervenção que sejam eficazes no controle e prevenção de tais processos, bem como, para a identificação dos principais preditores da atividade da GPx nesta população.

Diante do exposto, o presente estudo se propôs a investigar, em indivíduos jovens e saudáveis, as possíveis associações existentes entre a atividade eritrocitária da GPx e os fatores de risco para a ocorrência da síndrome metabólica: parâmetros antropométricos, bioquímicos e clínicos; e, compostos antioxidantes não enzimáticos: de origem endógena ou dietética.

4.2. Voluntários e métodos

4.2.1. Voluntários

O presente estudo avaliou 101 indivíduos jovens e saudáveis, com idade entre 18 e 35 anos (53 mulheres e 48 homens; idade: $23,1 \pm 3,4$ anos [média \pm DP]; índice de massa corporal: $22,0 \pm 2,7$ kg/m² [média \pm DP]).

Para a triagem inicial dos voluntários considerou-se como critérios de exclusão a evidência de qualquer doença relacionada ao estresse oxidativo, inflamação crônica, desequilíbrios hídricos, mudanças na composição corporal ou presença de alterações na absorção e/ou metabolismo de nutrientes. Outros critérios de exclusão se referiram ao uso de medicamentos ou tratamento nutricional que afetasse o balanço energético, consumo alimentar, perfil lipídico, concentrações plasmáticas de insulina e metabolismo da glicose; o início do uso

regular de anticoncepcionais nos 2 meses anteriores à participação no presente estudo; adesão à práticas dietéticas para a perda de peso ou peso instável nos últimos 6 meses (perda ou ganho de 10% do peso corporal).

Em conformidade com os princípios da declaração de *Helsinki* e após explicação clara sobre o protocolo do estudo, cada participante assinou o termo de consentimento livre e esclarecido, permitindo sua participação voluntária. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (Of. ref. N ° 009/2006).

4.2.2. Parâmetros antropométricos e de composição corporal

A estatura foi aferida utilizando-se estadiômetro (*Seca 206 model, Hamburg, Germany*), com extensão máxima de 2 metros, subdividido em milímetros. Para a aferição do peso corporal utilizou-se balança digital eletrônica (*Tanita TBF-300A model, Tokyo, Japan*), com capacidade máxima de 180 quilogramas e aproximação de 100 gramas. O índice de massa corporal foi calculado pela razão entre o peso corporal (quilogramas) e a estatura ao quadrado (metros).

A circunferência da cintura foi medida no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca e a do quadril na maior circunferência horizontal entre a cintura e os joelhos, sem contração glútea (Salas-Salvado, Rubio et al. 2007). Ambas as circunferências foram aferidas utilizando-se fita métrica flexível e inelástica, subdividida em milímetros. Foi calculada a relação entre as circunferências da cintura e quadril.

As pregas cutâneas tricipital, bicipital, subescapular e suprailíaca foram aferidas utilizando-se adipômetro (*Lange caliper, Cambridge Scientific Industries Inc., Cambridge, Maryland, USA*) com aproximação de 1 milímetro, conforme técnica previamente padronizada (Durnin and Womersley 1974). Procedeu-se ao cálculo do percentual de gordura troncular pela razão entre o somatório das pregas cutâneas subescapular e suprailíaca e o somatório das 4 pregas cutâneas (Warnberg, Nova et al. 2006).

O percentual de gordura corporal total foi obtido mediante análise da bioimpedância elétrica horizontal (*Biodynamics 310 model, Washington, USA*), a partir da qual também foram estimados a massa de gordura e livre de gordura corporal em quilogramas.

4.2.3. Pressão arterial

Os níveis de pressão arterial sistólica e diastólica foram aferidos mediante esfigmomanômetro mecânico de coluna de mercúrio (BIC, São Paulo, Brasil), com aproximação de 2 mmHg, conforme técnica descrita anteriormente (Perloff, Grim et al. 1993).

4.2.4. Análise de amostras biológicas

A coleta de sangue foi realizada por punção venosa, após jejum de 12 horas. As amostras de plasma EDTA (*ethylene-diaminetetra-acetic-acid*), plasma heparina e soro foram separadas do sangue total mediante centrifugação a 2465 g a 5°C por 15 minutos (*Eppendorf AG, 5804R model, Hamburg, Germany*). Os eritrócitos foram obtidos por centrifugação a 1811 g a 5°C por 10 minutos. As amostras foram imediatamente armazenadas a -80°C até o momento das análises.

As concentrações séricas de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-c), triacilgliceróis, ácido úrico e ceruloplasmina (mg/dL), foram analisadas por ensaio colorimétrico ou turbidimétrico, mediante analisador automático (*BS-200, Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co., Nanshan, China*) utilizando-se kits de análise específicos (*BS-200, Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co., Nanshan, China*).

A lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) foi calculada pela equação de Friedwald, previamente estabelecida (Friedewald, Levy et al. 1972) e posteriormente validada (Tremblay, Morrissette et al. 2004). Procedeu-se também ao cálculo da razão colesterol total/HDL-c, conforme preconizado (Castelli 1988).

A concentração plasmática de insulina (sensibilidade de 2 µU/mL) foi analisada por ensaio imuno enzimático, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando-se material e reagentes providos por kit de análise específico (*Linco Research, St. Charles, USA*): placa recoberta com anticorpo de captura anti insulina humana (anticorpo monoclonal de coelho); anticorpo de detecção anti insulina humana (anticorpo monoclonal de coelho biotinilado) e substrato TMB (3, 3', 5, 5'-*tetrametilbenzidina*). Procedeu-se à dosagem em plasma EDTA, o ensaio foi realizado conforme protocolo descrito no kit de análise.

A resistência à insulina foi estimada pelo modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR), previamente estabelecido (Matthews, Hosker et al. 1985).

A atividade eritrocitária da glutathiona peroxidase (GPx) foi aferida por ensaio de cinética enzimática, mediante kit de análise específico (*Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, catalog no.*

703102). O ensaio se baseou na ocorrência de duas reações acopladas. A primeira catalisada pela GPx, referente à redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água, às custas da conversão da glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSH). A GSSH refere-se ao substrato para da segunda reação, catalizada por outra enzima, a glutathiona redutase, que recupera a GSH às custas da oxidação do NADPH a $NADP^+$. A oxidação do NADPH foi acompanhada por decaimento da absorvância a 340 nm, diretamente proporcional a atividade eritrocitária da GPx, expressa em nmol/mL/minuto, referente a quantidade de GPx capaz de oxidar 1 nmol de NADPH por mL de amostra por minuto.

As concentrações plasmáticas de LDL oxidada (LDLox; sensitivity < 6.56 U/L) foram analisadas por ELISA, utilizando-se material e reagentes providos por kit de análise específico (*Mercodia, Uppsala, Suécia*): placa recoberta com anticorpo de captura anti LDLox humana (anticorpo monoclonal de camundongo, murino específico, mAB-4E6); anticorpo monoclonal de camundongo anti Apo B 100, conjugado à peroxidase, diluído a 1:10 e substrato TMB, contendo peróxido de hidrogênio e cromóforo. Procedeu-se à dosagem em plasma EDTA, com diluição a 1:6561, o ensaio foi realizado conforme protocolo descrito no kit de análise.

A capacidade antioxidante total (CAT) do plasma foi aferida por ensaio colorimétrico, por meio de kit de análise específico (*Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, catalog no. 709001*). O ensaio foi baseado na habilidade de todos os antioxidantes presentes na amostra (plasma) em inibir a oxidação do substrato oxidável ABTS (*2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]*) a $ABTS^{*+}$ pela metimioglobina. A quantidade de substrato oxidado ($ABTS^{*+}$) foi monitorada por leitura de absorvância a 750 nm. O decaimento da absorvância a 750 nm foi diretamente proporcional à concentração de antioxidantes no plasma, expressa em mM de trolox equivalente, antioxidante sintético, hidrossolúvel, análogo a vitamina E.

Foram coletadas as amostras de unhas dos pés e das mãos, mediante limpeza prévia com água e sabão e retirada de esmalte e, em seguida, armazenadas a temperatura ambiente, em sacos de polipropileno. O preparo das amostras incluía seu tratamento ácido sob aquecimento (ácido nítrico fervente), sob altas pressões, em recipiente de teflon (digestor), usando um sistema de digestão de microondas (*Ethos Plus, Millestone, Sorisole, Italy*). Após a digestão ácida, as concentrações de cobre, zinco e selênio foram analisadas por espectrofotometria de absorção atômica de chama (*Perkin Elmer AAnalyst 800; Norwalk, CT, USA*), conforme técnica estabelecida anteriormente (Navarro-Blasco and Alvarez-Galindo 2004). Os valores de

concentração foram ajustados para o peso da amostra, e foram expressas em micrograma por grama de unha ($\mu\text{g/g}$ de unha) para o cobre e o zinco e em nanograma por grama de unha (ng/grama de unha) para o selênio.

4.2.5. Consumo alimentar e variáveis de estilo de vida

A ingestão dietética diária (calorias, carboidrato, proteína, lipídio, fibra, colesterol, ácidos graxos saturados, mono e poliinsaturados, vitaminas C e A, ferro, cobre e zinco) foi avaliada mediante aplicação de registro alimentar de 72 horas, utilizando-se software específico *DietPRO*, versão 5.0, *AS sistemas* (DietPRO 2009). Os voluntários eram orientados a registrar em formulário próprio todos os alimentos e bebidas consumidos, bem como suas quantidades, ao longo de um dia. Esse procedimento foi realizado por três dias não consecutivos, incluindo um dia de final de semana.

Variáveis de estilo de vida tais como: uso de suplementos vitamínicos, tabagismo (fumantes ou não-fumantes), número de cigarros por dia, prática regular de atividade física (sim ou não) e intensidade da atividade física também foram coletados. Para quantificar a intensidade de atividade física, foi utilizado o índice metabólico equivalente (MET). Este índice representa a razão entre a quantidade de energia (kcal) despendida para a realização de uma determinada atividade física e a energia equivalente à situação de repouso. Convencionalmente, considera-se que a situação de repouso refere-se ao MET = 1. As pontuações dos METs foram fornecidas pelo Compêndio de Atividades Físicas (Amorim and Gomes 2003), um esquema de codificação que classifica as atividades físicas de acordo com seu dispêndio energético em relação à situação de repouso (Ainsworth, Haskell et al. 1993; Ainsworth, Haskell et al. 2000). Os METs, para cada atividade específica, foram calculados multiplicando o tempo gasto em cada atividade pela sua pontuação de MET, procedendo-se ao somatório de todas as atividades realizadas ao longo de uma semana, obtendo-se um valor médio, expresso em horas por dia.

4.2.6. Análise estatística

Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. De acordo com a distribuição das variáveis, foi adotado o teste *Student-t*, paramétrico, ou seu equivalente não paramétrico, o teste de *Mann-Whitney-U*, para a comparação entre os grupos

categorizados pela mediana da distribuição da atividade eritrocitária da GPx. Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste de qui-quadrado- χ^2 .

Foi utilizada a correlação de *Spearman* para rastrear a associação entre a atividade eritrocitária da GPx e as demais variáveis de interesse. Modelos de regressão linear simples foram utilizados para identificar os fatores preditivos da atividade eritrocitária da GPx (variável dependente). Estes modelos foram previamente ajustados para as covariáveis sexo, idade, tabagismo e atividade física, quando estes fatores mostraram efeito significativo.

Os resultados foram apresentados como média \pm DP. O intervalo de confiança de 95% foi utilizado para descrever os valores do coeficiente de regressão linear (β) e o de regressão logística, odds ratio (OR). Foi considerado o nível de significância estatística de 5 % de probabilidade ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS sistema versão 8.0 para Windows, *SAS Institute Inc., Cary, NC 27513, E.U.A.* (SAS 2001).

4.3. Resultados

Os parâmetros antropométricos, clínicos e bioquímicos (média \pm DP) categorizados pelo valor da mediana da atividade da GPx (522,63 nmol/[ml/min]) são apresentados na Tabela 3.1. Indivíduos com maior atividade enzimática da GPx demonstraram maiores valores de idade e níveis circulantes de LDL oxidada e por outro lado, menores concentrações dos minerais selênio e cobre nas unhas. Nenhum outro parâmetro bioquímico, antropométrico ou de composição corporal diferiu entre os dois grupos referentes à atividade da GPx ($\leq 522,63$ nmol/[ml/min] *versus* $> 522,63$ nmol/[ml/min]). Da mesma forma, não foram encontradas diferenças relacionadas aos níveis de pressão arterial.

Na Tabela 3.2, são apresentadas as variáveis de estilo de vida e ingestão dietética diária de antioxidantes, também categorizadas pelo valor mediano da atividade da GPx (522,63 nmol/[ml/min]). Indivíduos com maior atividade enzimática da GPx demonstraram maior ingestão diária de vitamina C, nenhum outro nutriente diferiu entre as duas categorias da atividade da GPx. Da mesma forma, não houve diferença para nenhuma das variáveis de estilo de vida.

A atividade enzimática da GPx se correlacionou positivamente aos valores percentuais de gordura troncular ($r = 0,24$; $P = 0,016$), níveis circulantes de LDL oxidada ($r = 0,28$; $P = 0,004$) e ingestão diária de vitamina C ($r = 0,28$; $P = 0,007$) e negativamente à concentração de selênio nas

unhas ($r = -0,24$; $P = 0,026$) (Tabela 3.3). Nenhuma correlação foi encontrada para as variáveis de estilo de vida, tais como, números de cigarros/dia ou gasto calórico da atividade física relacionado ao gasto energético de repouso (MET) (dados não apresentados em tabela).

Mediante análise de regressão simples, observou-se que o percentual de gordura troncular, bem como, os níveis circulantes de LDL oxidada foram preditores positivos da atividade enzimática da GPx. O acréscimo de 1 unidade no percentual de gordura troncular (1%) e na concentração plasmática de LDL oxidada (1 U/L), foi capaz de se associar ao aumento de 10,665 nmol/[ml/min] e 2,430 nmol/[ml/min] na atividade da GPx, respectivamente. Cabe ressaltar que 5,9% do aumento na atividade da GPx foi devido ao efeito do percentual de gordura troncular, ao passo que 7,4%, aos níveis circulantes de LDL oxidada (Tabela 3.4).

Tabela 3.1: Parâmetros antropométricos, clínicos e bioquímicos (média ± DP) categorizados pelo valor da mediana (522,63 nmol/[ml/min]) da atividade eritrocitária da GPx

	atividade da GPx ≤ 522,63 nmol/[ml/min] (n=51)	atividade da GPx > 522,63 nmol/[ml/min] (n=50)	P
^{s*} Idade (anos)	22,7 ± 3,8	23,5 ± 2,9	0,026
Peso Corporal (kg)	62,9 ± 11,4	63,5 ± 10,8	0,357
IMC (kg/m ²)	22,1 ± 2,8	21,9 ± 2,6	0,281
Circunferência da Cintura (cm) ¹	78,2 ± 8,6	78,3 ± 8,5	0,973
Circunferência do Quadril (cm) ¹	95,9 ± 6,0	94,9 ± 6,2	0,434
Relação Cintura/Quadril ¹	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,487
PC Tricipital (mm) ¹	18,0 ± 7,0	16,8 ± 6,7	0,369
PC Bicipital (mm)	7,6 ± 4,5	6,5 ± 3,5	0,123
PC Supraíliac (mm)	17,6 ± 8,4	17,2 ± 9,4	0,269
PC Subscapular (mm)	16,5 ± 6,4	17,0 ± 7,2	0,359
Soma das 4 PC (mm)	59,8 ± 22,8	57,5 ± 25,1	0,210
Gordura Troncular (%) ¹	57,0 ± 6,8	59,3 ± 5,9	0,068
Gordura Total (%) ¹	23,2 ± 6,4	21,9 ± 6,1	0,286
Massa de Gordura (kg)	14,5 ± 4,6	13,9 ± 5,0	0,142
Massa Livre de Gordura (kg)	48,4 ± 10,0	49,6 ± 9,1	0,220
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	11,1 ± 0,9	11,0 ± 0,9	0,229
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	7,4 ± 0,7	7,4 ± 0,6	0,428
Glicose (mg/dL) ¹	90,5 ± 6,4	90,7 ± 6,6	0,884
Insulina (μU/mL) ^a	10,8 ± 5,1	9,9 ± 6,5	0,105
HOMA-IR ^a	2,4 ± 1,2	2,2 ± 1,3	0,137
Colesterol Total (mg/dL) ¹	156,4 ± 30,2	148,3 ± 21,8	0,129
HDL-c (mg/dL) ^{1,b}	45,6 ± 10,0	42,4 ± 10,2	0,119
LDL-c (mg/dL)	94,4 ± 28,9	88,1 ± 18,7	0,178
Triacilgliceróis (mg/dL)	95,2 ± 30,0	93,5 ± 37,1	0,221
Relação Colesterol Total/HDL-c ^b	3,5 ± 0,7	3,6 ± 1,0	0,209
Ácido Úrico (mg/dL) ¹	3,8 ± 1,2	3,5 ± 1,0	0,319
Ceruloplasmina (mg/dL)	36,8 ± 7,9	35,2 ± 7,0	0,138
^{s*} Selênio (ng/g de unha) ^{1,c}	393,8 ± 84,5	360,1 ± 64,4	0,045
Zinco (μg/g de unha) ^c	125,3 ± 48,4	133,2 ± 72,9	0,370
^{s*} Cobre (μg/g de unha) ^c	7,9 ± 5,6	6,3 ± 4,4	0,046
CAT (mM) ^b	1,8 ± 1,0	1,6 ± 1,0	0,109
^{s*} LDLox (U/L) ^{1,d}	70,4 ± 31,3	83,9 ± 31,2	0,033

DP, desvio padrão; GPx, glutatona peroxidase; IMC, índice de massa corporal; PC, prega cutânea; HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina; HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; CAT, capacidade antioxidante total do plasma; LDLox, lipoproteína de baixa densidade oxidada

¹ teste *Student t* foi realizado para as variáveis com distribuição normal, as demais variáveis foram analisadas pelo teste *Mann-Whitney U*

^a n=48 para atividade da GPx > 522,63 nmol/[ml/min]

^b n=48 para atividade da GPx ≤ 522,63 nmol/[ml/min]; n=49 para atividade da GPx > 522,63 nmol/[ml/min]

^c n=41 para atividade da GPx ≤ 522,63 nmol/[ml/min]; n=41 para atividade da GPx > 522,63 nmol/[ml/min]

^d n=50 para atividade da GPx ≤ 522,63 nmol/[ml/min]

^{s*} diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05)

Tabela 3.2: Variáveis de estilo de vida e ingestão dietética diária (média ± DP) categorizadas pelo valor da mediana (522,63 nmol/[ml/min]) da atividade eritrocitária da GPx

	atividade da GPx ≤ 522,63 nmol/[ml/min] (n=51)	atividade da GPx > 522,63 nmol/[ml/min] (n=50)	P
<i>Variáveis de Estilo de Vida</i>			
Uso de suplementação de vitaminas (%) ¹	1,9	10,0	0,178
Tabagismo (%) ^{1,a}	11,6	13,6	0,316
Prática regular de atividade física (%) ^{1,a}	76,7	72,7	0,736
Cigarros/dia ^a	1,2 ± 3,9	2,5 ± 7,1	0,262
MET (h/dia) ^a	30,9 ± 10,6	31,1 ± 9,3	0,340
<i>Ingestão Dietética Diária de Nutrientes</i>			
<i>Antioxidantes^b</i>			
Vitamina A (mg) ²	780,9 ± 383,8	868,5 ± 556,2	0,412
^{s*} Vitamina C (mg)	118,9 ± 132,9	136,2 ± 71,3	0,010
Cobre (mg)	1,2 ± 0,7	1,1 ± 0,58	0,471
Zinco (mg) ²	9,0 ± 3,4	7,7 ± 3,7	0,089

DP, desvio padrão; GPx, glutathione peroxidase; MET, índice metabólico equivalente

¹ teste *qui-quadrado* χ^2 test para variáveis categóricas

² teste *Student t* foi realizado para as variáveis com distribuição normal, as demais variáveis foram analisadas pelo teste *Mann-Whitney U*

^a n=43 para atividade da GPx ≤ 522,63 nmol/[ml/min]; n=44 para atividade da GPx > 522,63 nmol/[ml/min]

^b n=39 para atividade da GPx ≤ 522,63 nmol/[ml/min]; n=44 para atividade da GPx > 522,63 nmol/[ml/min]

^{s*} diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05)

Tabela 3.3: Associação (coeficiente de correlação de *Spearman*: r) entre a atividade eritrocitária da GPx (nmol/[ml/min]) e os parâmetros antropométricos, clínicos, bioquímicos e ingestão dietética diária

	r	P
<i>Antropometria e Pressão Arterial (n=101)</i>		
Idade (anos)	0,16	0,114
Peso Corporal (kg)	0,10	0,315
IMC (kg/m ²)	-0,03	0,764
Circunferência da Cintura (cm)	0,05	0,637
Circunferência do Quadril (cm)	-0,09	0,340
Relação Cintura/Quadril	0,17	0,080
PC Tricipital (mm)	-0,12	0,215
PC Bicipital (mm)	-0,15	0,133
PC Suprailíaca (mm)	-0,06	0,539
PC Subescapular (mm)	0,06	0,513
Soma das 4 PC (mm)	-0,09	0,359
^{s*} Gordura Troncular (%)	0,24	0,016
Gordura Total (%)	-0,16	0,115
Massa de Gordura (kg)	-0,11	0,253
Massa Livre de Gordura (kg)	0,16	0,111
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	-0,05	0,602
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	0,01	0,983
<i>Parâmetros Bioquímicos (n=101)</i>		
Glicose (mg/dL)	-0,01	0,918
Insulina (μU/mL) ^a	-0,18	0,076
HOMA-IR ^a	-0,16	0,101
Colesterol Total (mg/dL)	-0,16	0,114
HDL-c (mg/dL) ^b	-0,14	0,164
LDL-c (mg/dL)	-0,14	0,171
Triacilgliceróis (mg/dL)	-0,13	0,178
Relação Colesterol Total/HDL-c ^b	0,05	0,628
Ácido Úrico (mg/dL)	-0,05	0,617
Ceruloplasmina (mg/dL)	-0,15	0,127
^{s*} Selênio (ng/g de unha) ^c	-0,24	0,026
Zinco (μg/g de unha) ^c	-0,05	0,652
Cobre (μg/g de unha) ^c	-0,19	0,075
CAT (mM) ^b	-0,07	0,489
^{s**} LDLox (U/L) ^d	0,28	0,004
<i>Ingestão Dietética Diária de Nutrientes Antioxidantes (n=83)</i>		
Vitamina A (mg)	0,12	0,249
^{s**} Vitamina C (mg)	0,28	0,007
Cobre (mg)	0,06	0,540
Zinco (mg)	-0,09	0,387

GPx, glutathiona peroxidase; IMC, índice de massa corporal; PC, prega cutânea; HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina; HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; CAT, capacidade antioxidante total do plasma; LDLox, lipoproteína de baixa densidade oxidada

^an=99; ^bn=97; ^cn=82; ^dn=100

^{s*} diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05)

^{s**} diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade (P < 0,01)

Tabela 3.4: Preditores da atividade eritrocitária da GPx (nmol/[ml/min]): regressão linear simples (n=101)

	coeficiente β (IC 95%)	P	r^2
<i>Predictors of Atividade da GPx</i>			
Idade (anos)	4,860 (-11,576 a 21,297)	0,558	0,003
^{s*} Gordura Troncular (%)	10,665 (2,214 a 19,117)	0,013	0,059
Selênio (ng/g de unha) ¹	-0,649 (-1,455 a 0,157)	0,113	0,030
Copper (μ g/g de unha) ¹	-10,586 (-22,686 a 1,514)	0,085	0,036
^{s**} LDLox (U/L) ²	2,430 (0,714 a 4,146)	0,006	0,074
Vitamina C (mg/d) ³	0,236 (-0,314 a 0,786)	0,395	0,008

GPx, glutationa peroxidase; LDLox, lipoproteína de baixa densidade oxidada

¹n=82, ²n=100, ³n=83

^{s*} diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$)

^{s**} diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade ($P < 0,01$)

4.4. Discussão

A atividade enzimática da GPx é comumente aferida em eritrócitos humanos pois nestas células, em função da auto-oxidação da hemoglobina, continuamente, são gerados espécies reativas de oxigênio e peróxido de hidrogênio (Misra and Fridovich 1972; Guemouri, Artur et al. 1991; Ceballos-Picot, Trivier et al. 1992; Andersen, Nielsen et al. 1997; Bolzan, Bianchi et al. 1997; Ashrafí, Shams et al. 2007; Ordonez and Rosety-Rodriguez 2007). No entanto, Andersen, Nielsen et al. (1997) apontaram que a atividade enzimática mensurada nos eritrócito pode não refletir a defesa antioxidante sistêmica. Estes pressupostos possivelmente justificam a ausência de associações, no presente estudo, entre a atividade eritrocitária da GPx e outros componentes do sistema antioxidante também avaliados: níveis séricos de ácido úrico e ceruloplasmina e capacidade antioxidante total do plasma.

Estudos prévios demonstraram que indivíduos portadores de condições patológicas associadas ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, quando comparados aos seus controles, exibiram maior atividade eritrocitária de GPx (Ashrafí, Shams et al. 2007; Ordonez and Rosety-Rodriguez 2007; Al-Gadani, El-Ansary et al. 2009), sugerindo assim que o aumento da atividade da GPx pode ser induzido pela instalação do estresse oxidativo decorrente de patologias associadas. O presente estudo foi capaz de demonstrar que mesmo em indivíduos saudáveis, isentos de condições patológicas associada ao estresse oxidativo, os níveis circulantes de LDL oxidada (condição oxidante) foram maiores entre aqueles cujos valores da atividade da GPx estavam acima da mediana. Da mesma forma, a atividade da GPx se correlacionou positivamente aos níveis circulantes da LDL oxidada. Por fim, mediante análise de regressão, os

níveis circulantes da LDL oxidada tiveram efeito positivo sobre a atividade da GPx, sendo que tal efeito foi capaz de explicar 7,4% da variação ocorrida na atividade enzimática da GPx (Tabela 3.4). Frente a estes achados é viável sugerir a possível ocorrência de um mecanismo regulatório, no qual, diante de condições oxidantes (aumento nos níveis circulantes de LDL oxidada) há um aumento na atividade da referida enzima, no sentido de restabelecer o equilíbrio redox. A atuação desse mecanismo regulatório, possivelmente é também o fator determinante das associações positivas encontradas entre o percentual de gordura troncular e a atividade enzimática da GPx. O acúmulo de tecido adiposo, sobretudo o visceral, predispõe à geração de espécies reativas de oxigênio (Furukawa, Fujita et al. 2004; Roberts and Sindhu 2009), o percentual de gordura troncular é um indicador indireto de tal acúmulo (Warnberg, Nova et al. 2006). No presente estudo, este indicador correlacionou-se positivamente à atividade da GPx. Por meio da análise de regressão, constatou-se que o acréscimo de 1 unidade no percentual de gordura troncular foi capaz de se associar ao aumento de 10.665 nmol/[ml/min] na atividade da referida enzima, sendo que este acréscimo explicou 5,9% da variação na atividade enzimática em questão (Tabela 3.4).

Barbosa, Bressan et al. (2008), em estudo de revisão, ressaltaram que inúmeros estudos de suplementação vêm evidenciando os efeitos benéficos das vitaminas e minerais antioxidantes sobre os biomarcadores do estresse oxidativo. As vitaminas C e E estão entre as que têm seu efeito antioxidante mais amplamente investigado (Meydani and Meisler 1997; Evstigneeva, Volkov et al. 1998; Vincent, Innes et al. 2007; Barbosa, Bressan et al. 2008). No presente estudo, apesar da vitamina C não ter sido capaz de exercer efeito preditivo sobre a atividade da GPx, sua ingestão dietética diária foi maior entre os indivíduos cujos valores da atividade enzimática em questão estavam acima da mediana e da mesma forma, mostrou-se correlacionada positivamente à atividade da GPx. Estes resultados, refletidos pela associação positiva entre as variáveis em questão (ingestão dietética de vitamina C e atividade da GPx), estão em concordância com outros estudos (Aksoy, Vural et al. 2005; Shireen, Pace et al. 2008). A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel que além de exercer efeito direto sobre a eliminação de espécies reativas de oxigênio, por meio de sua atuação como potente agente redutor, ainda é capaz de agir sinergicamente, potencializando a atividade de outros antioxidantes, entre eles o selênio e a vitamina E (Rodrigo, Guichard et al. 2007; Vincent, Innes et al. 2007). A ação sinérgica com o selênio se dá pelo fato da vitamina C preservar a atividade antioxidante deste mineral (May 2000). No mesmo sentido, age restaurando os níveis de vitamina E, possibilitando a atuação desta

vitamina na proteção contra a peroxidação lipídica das membranas celulares, ação exercida pela conversão do radical ânion superóxido e peróxido de hidrogênio em formas mais estáveis e, portanto menos reativas (May 2000; Packer, Weber et al. 2001). A GPx é por excelência uma enzima antioxidante que tem como substratos os peróxidos de hidrogênio e orgânicos e atua, com considerável eficiência, na proteção das membranas celulares (Little, Olinescu et al. 1970). Dessa forma o efeito sinérgico que a vitamina C exerce sobre a atividade de outros compostos antioxidantes, especialmente sobre a vitamina E, possivelmente é o fator determinante da associação positiva observada entre a sua ingestão dietética diária e a atividade enzimática da referida enzima.

O efeito do selênio sobre o aumento da atividade da GPx também vem sendo destacado (Olivieri, Stanzial et al. 1994; El-Bayoumy, Richie et al. 2002; Elango, Samuel et al. 2006; Mishra, Baines et al. 2007). Esse mineral tem recebido atenção especial em função de ser um componente essencial, inserido no centro catalítico da GPx, ligado covalentemente a um resíduo de cisteína, constituindo-se em selenocisteína (Steinbrenner and Sies 2009). O estado nutricional de selênio pode ser aferido por meio da sua dosagem no soro, plasma, eritrócitos, plaquetas ou ainda no sangue total (Al-Saleh and Billedo 2006). No presente estudo, a dosagem de selênio se refere à sua concentração nas unhas, marcador capaz de refletir o estado nutricional pregresso deste mineral em longo prazo. O período de tempo refletido não pode ser especificado precisamente, estima-se que varie entre 6 e 18 meses precedentes (Hunter, Morris et al. 1990; Al-Saleh and Billedo 2006), ao passo que sua dosagem sanguínea reflete a ingestão dietética atual (Longnecker, Stampfer et al. 1993). No presente estudo, observou-se que a concentração de selênio nas unhas associou-se negativamente à atividade da GPx (teste de *Mann-Whitney* e correlação de *Spearman*), o que pode ser devido ao fato da dosagem de selênio nas unhas refletir sua ingestão dietética pregressa (6 a 18 meses precedentes), uma vez que a atividade enzimática da GPx, aferida em eritrócitos, limita-se ao período máximo de 120 dias precedentes, meia vida dessas células (Rea, Thomson et al. 1979). Este pressuposto é corroborado pelo achado de que a atividade da GPx é estreitamente correlacionada à dosagem sérica de selênio, marcador de sua ingestão atual (Al-Saleh and Billedo 2006). A dosagem de selênio nas unhas tem maior aplicabilidade quando relacionada aos efeitos retrospectivos e de caráter crônico, não sendo afetada por sua ingestão dietética recente, cabendo ressaltar que alterações no padrão de ingestão dietética deste mineral serão refletidos nas unhas somente após 3 meses (Longnecker, Stampfer et

al. 1993). A forma química do selênio determina a duração de sua vida média nos tecidos periféricos antes da sua incorporação nas unhas. As formas orgânicas, incluindo a selenocisteína, têm vida média de 15 a 50 dias (Swanson, Patterson et al. 1991), enquanto que a forma de selenito de sódio tem mais de 100 dias (Hawkes, Alkan et al. 2003). Os baixos níveis de ingestão dietética de selênio atenuam sua incorporação nas unhas, uma vez que este mineral é requerido preferencialmente para cumprir sua demanda metabólica (Ovaskainen, Virtamo et al. 1993), que em parte se refere a sua inserção no centro catalítico da GPx (Steinbrenner and Sies 2009).

A aferição da ingestão dietética de selênio é bastante comprometida pela ampla variação do seu conteúdo nos alimentos (Combs 2001). Este conteúdo varia consideravelmente em função dos níveis deste mineral no solo, o que por sua vez, é determinado por diversos fatores, entre eles: localização geográfica, características da água e conteúdo de micro elementos nos fertilizantes utilizados (Longnecker, Taylor et al. 1991; Al-Saleh and Billedo 2006). Alguns estudos epidemiológicos associaram os baixos níveis de ingestão de selênio ao risco aumentado de doenças cardiovasculares (Kardinaal, Kok et al. 1997; Yoshizawa, Ascherio et al. 2003; Rajpathak, Rimm et al. 2005). Em função do seu papel protetor, a avaliação do estado nutricional de selênio tem gerado grande interesse. Para tal, a dosagem da concentração de selênio nas unhas surge como alternativa interessante, uma vez que é capaz de refletir sua ingestão dietética e ainda apresenta-se como um método menos invasivo que a dosagem sérica (Longnecker, Taylor et al. 1991; Longnecker, Stampfer et al. 1993; Ovaskainen, Virtamo et al. 1993; Al-Saleh and Billedo 2006).

No presente estudo, apesar da concentração de selênio nas unhas não ter sido capaz de apresentar-se como fator preditivo positivo da atividade da GPx, mostrou-se positivamente correlacionada a outros parâmetros relacionados à defesa antioxidante: capacidade antioxidante total do plasma ($r = 0,29$; $P = 0,008$) e dosagem de outros minerais antioxidantes na unhas: zinco ($r = 0,36$; $P = 0,001$) e cobre ($r = 0,38$; $P = 0,001$) (resultados não apresentados em tabela). Estes minerais são cofatores da superóxido dismutase, enzima de cuja atividade decorre a geração de peróxido de hidrogênio, principal substrato da GPx (Andersen, Nielsen et al. 1997; Bolzan, Bianchi et al. 1997; Ferreira and Matsubara 1997). A capacidade antioxidante total do plasma diz respeito à concentração de antioxidantes totais na amostra, incluindo além do sistema enzimático, componentes como: ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, glutatona reduzida, ácido úrico,

bilirrubina, albumina, ceruloplasmina e ferritina (Ferreira and Matsubara 1997; Vincent, Innes et al. 2007).

Idade, sexo e outros fatores associados ao estilo de vida como, tabagismo e uso de suplementos dietéticos, são determinantes da atividade de enzimas antioxidantes em eritrócitos humanos, sobretudo da atividade enzimática da GPx (Jozwiak and Jasnowska 1985; Guemouri, Artur et al. 1991; Ceballos-Picot, Trivier et al. 1992; Andersen, Nielsen et al. 1997; Bolzan, Bianchi et al. 1997; Pavao, Cordeiro et al. 2003). Alguns estudos demonstraram haver um incremento na atividade da GPx com o aumento da idade (Jozwiak and Jasnowska 1985; Ceballos-Picot, Trivier et al. 1992; Bolzan, Bianchi et al. 1997; Pavao, Cordeiro et al. 2003), achado que corrobora o fato de que no presente estudo, indivíduos cuja atividade de GPx estava acima do valor da mediana, apresentaram idade mais elevada. Por outro lado, outros autores apontaram associação negativa entre idade e atividade da GPx (Guemouri, Artur et al. 1991) ou não encontraram nenhuma associação entre estas variáveis (Andersen, Nielsen et al. 1997). Ceballos-Picot, Trivier et al. (1992) sugeriram que o aumento da atividade da GPx com o aumento da idade pode consistir em mecanismo adaptativo, uma vez que as concentrações de peróxido de hidrogênio nos eritrócitos tendem a aumentar mediante o envelhecimento. O efeito do sexo sobre a atividade da GPx também é alvo de resultados ainda não conclusivos, onde alguns estudos relatam maior atividade enzimática entre mulheres (Guemouri, Artur et al. 1991; Berr, Nicole et al. 1993), outros não (Ceballos-Picot, Trivier et al. 1992; Andersen, Nielsen et al. 1997; Bolzan, Bianchi et al. 1997; Pavao, Cordeiro et al. 2003). No presente estudo a atividade enzimática da GPx não diferiu entre homens (615,62 nmol/mL/min) e mulheres (550,45 nmol/mL/min) (resultados não apresentados em tabela). No tocante ao efeito do tabagismo, Andersen, Nielsen et al. (1997) encontraram que a atividade da GPx foi maior entre os não fumantes, no entanto após o ajuste por possíveis fatores de confundimento (idade, sexo, ingestão de suplementos dietéticos, álcool e cafeína) o tabagismo não foi fator preditivo da atividade da referida enzima. No presente estudo, o tabagismo não esteve associado à atividade da GPx, achado corroborado por outros estudos (Guemouri, Artur et al. 1991; Bolzan, Bianchi et al. 1997; Pavao, Cordeiro et al. 2003). Andersen, Nielsen et al. (1997) apontaram a ingestão de suplementos vitamínicos como fator preditivo positivo da atividade da GPx. No presente estudo, a pequena frequência de fumantes (10,8%) e consumidores de suplemento de vitamina (5,9%), pode ser determinante da falta de associação entre estas variáveis e a atividade da GPx. A

atividade das enzimas antioxidantes, sobretudo da GPx, é passível de grande variabilidade interindividual, Bolzan, Bianchi et al. (1997) ressaltaram que o coeficiente de variação da GPx (36,2%) superou o das demais enzimas antioxidantes: catalase (21,0%) e superóxido dismutase (13,5%). Tal variabilidade possivelmente explica em parte, a controvérsia dos efeitos de idade, sexo e outros fatores relacionados ao estilo de vida sobre a atividade da GPx. Outras fontes de variação seriam a diferença entre os ensaios utilizados para aferir a atividade enzimática, bem como, a heterogeneidade dos critérios de seleção dos participantes dos estudos (Ceballos-Picot, Trivier et al. 1992).

Em indivíduos jovens e aparentemente saudáveis, condições oxidantes como, os níveis circulantes de LDL oxidada e o percentual de gordura troncular, foram capazes de predizer o aumento da atividade eritrocitária da GPx. Tal fato aponta a possível atuação de um mecanismo regulatório, no qual o aumento da atividade antioxidante da referida enzima, ocorre no sentido de restaurar o equilíbrio redox do sistema biológico. A associação positiva entre a ingestão diária de vitamina C e a atividade da GPx corrobora a ação sinérgica desta vitamina sobre outros compostos do sistema de defesa antioxidante. O avançar da idade é um dos fatores determinantes do aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, entre elas o peróxido de hidrogênio, substrato da GPx. Neste contexto, a associação positiva entre esses variáveis (idade e atividade da GPx) encontra respaldo. A dosagem de selênio nas unhas, apesar de ser uma alternativa interessante para a avaliação do estado nutricional deste mineral, não foi capaz de refletir o aumento da atividade da GPx. A atividade eritrocitária da GPx é um importante biomarcador da capacidade antioxidante do sistema de defesa enzimático, pois além de desempenhar importante papel na manutenção da integridade desse sistema e, por conseguinte de sua eficácia, é a enzima que apresenta maior afinidade para peróxidos o que a capacita como um importante componente na proteção contra a peroxidação lipídica das membranas celulares. No entanto, a variabilidade biológica da atividade da GPx, é um fator limitante da sua aplicação como indicador de eventos fisiopatológicos, predisponentes à instalação da síndrome metabólica, processo intimamente associado ao estresse oxidativo.

4.5. Referências bibliográficas

- Ainsworth, B. E., W. L. Haskell, et al. (1993). "Compendium of physical activities: classification of energy costs of human physical activities." Med Sci Sports Exerc **25**(1): 71-80.
- Ainsworth, B. E., W. L. Haskell, et al. (2000). "Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities." Med Sci Sports Exerc **32**(9 Suppl): S498-504.
- Aksoy, N., H. Vural, et al. (2005). "Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats." Nutrition Research **25**(6): 625-630.
- Al-Gadani, Y., A. El-Ansary, et al. (2009). "Metabolic biomarkers related to oxidative stress and antioxidant status in Saudi autistic children." Clin Biochem **42**(10-11): 1032-40.
- Al-Saleh, I. and G. Billedo (2006). "Determination of selenium concentration in serum and toenail as an indicator of selenium status." Bull Environ Contam Toxicol **77**(2): 155-63.
- Amorim, P. R. and T. N. P. Gomes (2003). Métodos de baixo custo e aplicáveis na prática. Gasto energético na atividade física. P. R. Amorim and T. N. P. Gomes. Rio de Janeiro, Shape: 113 - 194.
- Andersen, H. R., J. B. Nielsen, et al. (1997). "Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes." Clin Chem **43**(4): 562-8.
- Ashrafi, M. R., S. Shams, et al. (2007). "A probable causative factor for an old problem: selenium and glutathione peroxidase appear to play important roles in epilepsy pathogenesis." Epilepsia **48**(9): 1750-5.
- Barbosa, K. B., J. Bressan, et al. (2008). "[Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans]." An Sist Sanit Navar **31**(3): 259-80.
- Benzie, I. F. and J. J. Strain (1996). "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay." Anal Biochem **239**(1): 70-6.
- Berr, C., A. Nicole, et al. (1993). "Selenium and oxygen-metabolizing enzymes in elderly community residents: a pilot epidemiological study." J Am Geriatr Soc **41**(2): 143-8.
- Bolzan, A. D., M. S. Bianchi, et al. (1997). "Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking." Clin Biochem **30**(6): 449-54.
- Castelli, W. P. (1988). "Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease--the Framingham Heart Study." Can J Cardiol **4 Suppl A**: 5A-10A.

- Ceballos-Picot, I., J. M. Trivier, et al. (1992). "Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes." Clin Chem **38**(1): 66-70.
- Combs, G. F., Jr. (2001). "Selenium in global food systems." Br J Nutr **85**(5): 517-47.
- DietPRO (2009). DietPRO, AS sistemas, versão 5.0. Viçosa.
- Durnin, J. V. and J. Womersley (1974). "Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years." Br J Nutr **32**(1): 77-97.
- El-Bayoumy, K., J. P. Richie, Jr., et al. (2002). "Influence of selenium-enriched yeast supplementation on biomarkers of oxidative damage and hormone status in healthy adult males: a clinical pilot study." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(11): 1459-65.
- Elango, N., S. Samuel, et al. (2006). "Enzymatic and non-enzymatic antioxidant status in stage (III) human oral squamous cell carcinoma and treated with radical radio therapy: influence of selenium supplementation." Clin Chim Acta **373**(1-2): 92-8.
- Evstigneeva, R. P., I. M. Volkov, et al. (1998). "Vitamin E as a universal antioxidant and stabilizer of biological membranes." Membr Cell Biol **12**(2): 151-72.
- Ferreira, A. L. and L. S. Matsubara (1997). "[Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]." Rev Assoc Med Bras **43**(1): 61-8.
- Friedewald, W. T., R. I. Levy, et al. (1972). "Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge." Clin Chem **18**(6): 499-502.
- Furukawa, S., T. Fujita, et al. (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." J Clin Invest **114**(12): 1752-61.
- Galili, O., D. Versari, et al. (2007). "Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(2): H904-11.
- Guemouri, L., Y. Artur, et al. (1991). "Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood." Clin Chem **37**(11): 1932-1937.
- Halliwell, B. and M. Whiteman (2004). "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?" Br J Pharmacol **142**(2): 231-55.

- Hawkes, W. C., F. Z. Alkan, et al. (2003). "Absorption, distribution and excretion of selenium from beef and rice in healthy North American men." J Nutr **133**(11): 3434-42.
- Hunter, D. J., J. S. Morris, et al. (1990). "Predictors of selenium concentration in human toenails." Am J Epidemiol **132**(1): 114-22.
- Jozwiak, Z. and B. Jasnowska (1985). "Changes in oxygen-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in human erythrocytes as a function of age of donor." Mech Ageing Dev **32**(1): 77-83.
- Kardinaal, A. F., F. J. Kok, et al. (1997). "Association between toenail selenium and risk of acute myocardial infarction in European men. The EURAMIC Study. European Antioxidant Myocardial Infarction and Breast Cancer." Am J Epidemiol **145**(4): 373-9.
- Little, C., R. Olinescu, et al. (1970). "Properties and regulation of glutathione peroxidase." J Biol Chem **245**(14): 3632-6.
- Longnecker, M. P., M. J. Stampfer, et al. (1993). "A 1-y trial of the effect of high-selenium bread on selenium concentrations in blood and toenails." Am J Clin Nutr **57**(3): 408-13.
- Longnecker, M. P., P. R. Taylor, et al. (1991). "Selenium in diet, blood, and toenails in relation to human health in a seleniferous area." Am J Clin Nutr **53**(5): 1288-94.
- Matthews, D. R., J. P. Hosker, et al. (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." Diabetologia **28**(7): 412-9.
- May, J. M. (2000). "How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction?" Free Radic Biol Med **28**(9): 1421-9.
- Meydani, M. and J. G. Meisler (1997). "A closer look at vitamin E. Can this antioxidant prevent chronic diseases?" Postgrad Med **102**(2): 199-201, 206-7.
- Mishra, V., M. Baines, et al. (2007). "Effect of selenium supplementation on biochemical markers and outcome in critically ill patients." Clin Nutr **26**(1): 41-50.
- Misra, H. P. and I. Fridovich (1972). "The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin." J Biol Chem **247**(21): 6960-2.
- Navarro-Blasco, I. and J. I. Alvarez-Galindo (2004). "Selenium content of Spanish infant formulae and human milk: influence of protein matrix, interactions with other trace elements and estimation of dietary intake by infants." J Trace Elem Med Biol **17**(4): 277-89.

- Olivieri, O., A. M. Stanzial, et al. (1994). "Selenium status, fatty acids, vitamins A and E, and aging: the Nove Study." Am J Clin Nutr **60**(4): 510-7.
- Ordonez, F. J. and M. Rosety-Rodriguez (2007). "Correlation between glutathione peroxidase activity and anthropometrical parameters in adolescents with Down syndrome." Res Dev Disabil **28**(1): 105-8.
- Ovaskainen, M. L., J. Virtamo, et al. (1993). "Toenail selenium as an indicator of selenium intake among middle-aged men in an area with low soil selenium." Am J Clin Nutr **57**(5): 662-5.
- Packer, L., S. U. Weber, et al. (2001). "Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling." J Nutr **131**(2): 369S-73S.
- Pavao, M., C. Cordeiro, et al. (2003). "Comparison of whole-blood glutathione peroxidase activity, levels of serum selenium, and lipid peroxidation in subjects from the fishing and rural communities of "Rabo de Peixe" village, San Miguel Island, the Azores' Archipelago, Portugal." Biol Trace Elem Res **92**(1): 27-40.
- Perloff, D., C. Grim, et al. (1993). "Human blood pressure determination by sphygmomanometry." Circulation **88**(5 Pt 1): 2460-70.
- Rajpathak, S., E. Rimm, et al. (2005). "Toenail selenium and cardiovascular disease in men with diabetes." J Am Coll Nutr **24**(4): 250-6.
- Rea, H. M., C. D. Thomson, et al. (1979). "Relation between erythrocyte selenium concentrations and glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) activities of New Zealand residents and visitors to New Zealand." Br J Nutr **42**(2): 201-8.
- Roberts, C. K. and K. K. Sindhu (2009). "Oxidative stress and metabolic syndrome." Life Sci **84**(21-22): 705-12.
- Rodrigo, R., C. Guichard, et al. (2007). "Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins." Fundam Clin Pharmacol **21**(2): 111-27.
- Salas-Salvado, J., M. A. Rubio, et al. (2007). "[SEEDO 2007 Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria]." Med Clin (Barc) **128**(5): 184-96; quiz 1 p following 200.
- Salvi, M., V. Battaglia, et al. (2007). "Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense." J Biol Chem **282**(33): 24407-15.
- SAS (2001). SAS Institute Inc., User's guide, version 8.0 (licenciado pela UFV). Cary, NC 27513, E.U.A.

- Schneider, C. D. and A. R. Oliveira (2004). "Radicales libres de oxígeno y ejercicio: mecanismos de formación y adaptación al entrenamiento." Rev Bras Med Esporte **10**(4): 308-313.
- Shan, X. Q., T. Y. Aw, et al. (1990). "Glutathione-dependent protection against oxidative injury." Pharmacol Ther **47**(1): 61-71.
- Shireen, K. F., R. D. Pace, et al. (2008). "Effects of dietary vitamin E, C and soybean oil supplementation on antioxidant enzyme activities in liver and muscles of rats." Food Chem Toxicol **46**(10): 3290-4.
- Steinbrenner, H. and H. Sies (2009). "Protection against reactive oxygen species by selenoproteins." Biochimica et Biophysica Acta doi: **10.1016/j.bbagen.2009.02.014**.
- Swanson, C. A., B. H. Patterson, et al. (1991). "Human [74Se]selenomethionine metabolism: a kinetic model." Am J Clin Nutr **54**(5): 917-26.
- Tremblay, A. J., H. Morrissette, et al. (2004). "Validation of the Friedewald formula for the determination of low-density lipoprotein cholesterol compared with beta-quantification in a large population." Clin Biochem **37**(9): 785-90.
- Vincent, H. K., K. E. Innes, et al. (2007). "Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity." Diabetes Obes Metab **9**(6): 813-39.
- Warnberg, J., E. Nova, et al. (2006). "Inflammatory proteins are related to total and abdominal adiposity in a healthy adolescent population: the AVENA Study." Am J Clin Nutr **84**(3): 505-12.
- Welch, K. D., T. Z. Davis, et al. (2002). "Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules." Free Radic Biol Med **32**(7): 577-83.
- Yoshizawa, K., A. Ascherio, et al. (2003). "Prospective study of selenium levels in toenails and risk of coronary heart disease in men." Am J Epidemiol **158**(9): 852-60.
- Yu, B. P. (1994). "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species." Physiol Rev **74**(1): 139-62.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo foi capaz de demonstrar, que mesmo em indivíduos jovens e aparentemente saudáveis, isentos de condições patológicas que estejam associadas à maior geração de radicais livres e/ou a menor capacidade das defesas antioxidantes, os níveis circulantes de LDL oxidada (LDLox), a capacidade antioxidante total do plasma (CAT) e a atividade eritrocitária da glutatona peroxidase (GPx), já se mostraram associados a alguns parâmetros antropométricos e de composição corporal (indicadores de adiposidade total e acúmulo de adiposidade visceral); bioquímicos (indicadores de dislipidemia, hiperglicemia, risco aterogênico e resistência à insulina); clínicos (indicadores de hipertensão arterial) e dietéticos.

A concentração plasmática de LDLox pode ser apontada como um indicador precoce dos determinantes da síndrome metabólica em população jovem e saudável. Em indivíduos normolipidêmicos, as frações lipídicas (CT, LDL-c e CT/HDL-c), já estiveram associadas ao aumento dos níveis circulantes deste biomarcador. Os resultados apontam a relevância de intervenções dietéticas realizadas no sentido de diminuir a colesterolemia e aumentar os níveis séricos de HDL-c, uma vez que possibilitam atuar precocemente sobre os eventos de oxidação da partícula LDL-c. Maiores níveis de LDLox estiveram associados ao aumento de 240% nas chances de apresentar hipertrigliceridemia. Mesmo diante de níveis séricos normais de ácido úrico (< 7 mg/dL), este componente demonstrou-se preditor positivo da concentração plasmática da LDLox, corroborando seu efeito aterogênico. A concentração de selênio na unha foi pela primeira vez, apontado como preditor negativo das concentrações plasmáticas de LDLox, respaldando seu efeito protetor sobre o risco aterogênico. A maior atividade eritrocitária da GPx diante dos maiores níveis plasmáticos de LDLox, sugere a atuação de mecanismo regulatório, que ocorre no sentido de restaurar o equilíbrio redox.

A CAT do plasma não esteve associada aos parâmetros antropométricos nem tampouco aos demais biomarcadores do estresse oxidativo (atividade da GPx e concentrações plasmáticas de LDLox). No entanto, a redução da ingestão diária de calorias (kcal/kg de peso corporal) e de carboidratos (g/kg de peso corporal) conseguiu predizer o aumento da CAT do plasma. Assim, o nível de ingestão calórica é o primeiro fator a atuar na modulação da CAT do plasma, antes de se estabelecer desvios antropométricos, de composição corporal e/ou metabólicos. Em condições fisiológicas, o aumento da CAT do plasma foi capaz de atuar como mecanismo compensatório frente a condições oxidantes. A CAT é um biomarcador de grande relevância biológica, pois

considera a totalidade dos componentes envolvidos no sistema de defesa antioxidante (fatores endógenos e dietéticos).

Condições oxidantes como, os níveis circulantes de LDL oxidada e o percentual de gordura troncular, foram capazes de predizer o aumento da atividade eritrocitária da GPx. A associação positiva entre a ingestão diária de vitamina C e a atividade da GPx corroborou a ação sinérgica desta vitamina sobre outros compostos do sistema de defesa antioxidante. A associação positiva entre idade e atividade da GPx encontrou respaldo no fato do avançar da idade ser um dos fatores determinantes do aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, entre elas o peróxido de hidrogênio, substrato da GPx. A dosagem de selênio nas unhas, apesar de ser uma alternativa interessante para a avaliação do estado nutricional deste mineral, não foi capaz de refletir o aumento da atividade da GPx. Considerando a associação negativa observada entre a dosagem de selênio nas unhas e a atividade da GPx, pode-se sugerir que a população do presente estudo, possivelmente, esteve deficiente em relação ao estado nutricional de selênio, uma vez que a incorporação desse mineral nas unhas ocorre mediante o cumprimento do seu requerimento biológico, ou seja, diante de condições oxidantes houve maior requerimento desse mineral para compor o centro catalítico da GPx, diminuindo assim, seu *pool* nas unhas, o que indica depleção de suas reservas. A atividade eritrocitária da GPx é um importante biomarcador da capacidade antioxidante do sistema de defesa enzimático, pois além de desempenhar importante papel na manutenção da integridade de tal sistema e, por conseguinte de sua eficácia, é a enzima que apresenta maior afinidade para peróxidos o que a capacita como um importante componente na proteção contra a peroxidação lipídica das membranas celulares. No entanto, a variabilidade biológica da atividade da GPx, é um fator limitante da sua aplicação como indicador de eventos fisiopatológicos, predisponentes à instalação da síndrome metabólica.

APÊNDICES



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

PROJETO MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO

ENTREVISTA TELEFÔNICA

CÓDIGO

NOME: _____

SEXO 1 Homen 2 Mulher

DATA DE NACIMIENTO: ____/____/____

CURSO: _____

TELEFONE DE CONTATO: Res.: _____

Cel.: _____

e-mail: _____

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

	SIM	NÃO
Tem idade compreendida entre 18 e 35 anos?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2 Idade: ____ anos
É portador de alguma doença / Infecção Recorrente/ Alergias?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2 qual: _____
Faz uso diário de algum medicamento?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2 qual: _____ duração: _____
Faz dieta ou participa de algum programa de controle de peso?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2 qual: _____ duração: _____
Faz uso de suplementos vitamínicos e/ou minerais?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2 qual: _____ duração: _____
Faz uso de algum outro suplemento? (tratamento fitoterápico)	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2 qual: _____ duração: _____
Apresentou alguma modificação brusca de peso nos últimos 6 meses?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2 quanto: _____ Kg motivo: _____

OBSERVAÇÕES



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

PROJETO MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO

1º ENCONTRO

CÓDIGO

DIA:
HORA:

	SIM	NÃO
Assinar Consentimento Livre Esclarecido (2 vias)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Entrega R72H para preenchimento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Orientações R72H (Kit de Medidas Caseiras)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Entrega da bolsa para coleta das unhas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Entrega das instruções para o 2º ENCONTRO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Marcar 2º ENCONTRO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Dia: ___/___ Hora: _____

DADOS GERAIS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

	SIM	NÃO
Teve algum processo infeccioso nos últimos 10 dias?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> qual: _____
É portador de alguma doença / Infecção Recorrente/ Alergias?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> qual: _____
Faz uso diário de algum medicamento?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> qual: _____ duração: _____
Faz dieta ou participa de algum programa de controle de peso?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> qual: _____ duração: _____
Faz uso de suplementos vitamínicos e/ou minerais?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> qual: _____ duração: _____
Faz uso de algum outro suplemento? (tratamento fitoterápico)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> qual: _____ duração: _____
Faz uso de shampoo e/ou loção especial para tratamento capilar?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> qual: _____ duração: _____
Compatibiliza estudo e trabalho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> trabalho: _____ horas/semana: _____



CÓDIGO

Se considera 1 Muito ativo 2 Ativo
 3 Sedentário 4 Muito sedentário

Mora 1 Com seus pais 2 República
 3 Alojamento 4 Outros: _____

DADOS ANTROPOMÉTRICOS E DE COMPOSIÇÃO CORPORAL

C. Braço (cm): _____ _____ _____ <input type="text"/>	C. Cintura (cm): _____ _____ _____ <input type="text"/>	C. Quadril (cm): _____ _____ _____ <input type="text"/>
P.Tricipital (mm): _____ _____ _____ <input type="text"/>	P.Bicipital (mm): _____ _____ _____ <input type="text"/>	P.Subescapular (mm): _____ _____ _____ <input type="text"/>
P.Suprailíaca (mm): _____ _____ _____ <input type="text"/>	Peso (kg): _____ _____ _____ <input type="text"/>	Estatura (cm): _____ _____ _____ <input type="text"/>
%Gordura Corporal: (pregas) _____ _____ <input type="text"/>	Razão Cintura/ Quadril (RCQ) _____ _____ <input type="text"/>	Índice de masa corporal (IMC): _____ _____ <input type="text"/>

OBSERVAÇÕES

**2º ENCONTRO**CÓDIGO

DIA:
HORA:

	SIM	NÃO
Devolução do R72H preenchido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Conferir R72H (Kit de medidas caseiras)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Devolução da bolsa com as unhas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Entrega das instruções para o 3º ENCONTRO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Marcar 3º ENCONTRO (entrega dos informes)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Dia: ___/___ Hora: _____

DATOS GERAIS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E PARA A COLETA DE SANGUE E REALIZAÇÃO DA BIA

	SIM	NÃO
Está em jejum de 12 horas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bebeu álcool, chá e/ou café nas últimas 24 horas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bebeu água nas últimas 4 horas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fez algum exercício físico no dia anterior?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tem a bexiga vazia?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Usa marcapasos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Usa prótese, piring ou aparelho dental?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MULHER: Esta menstruada?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Teve algum processo infeccioso nos últimos 10 dias?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> qual: _____
É portador de alguma doença / Infecção Recorrente/ Alergias?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> qual: _____
Faz uso diário de algum medicamento?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> qual: _____ duração: _____
Faz dieta ou participa de algum programa de controle de peso?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> qual: _____ duração: _____
Faz uso de suplementos vitamínicos e/ou minerais?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> qual: _____ duração: _____



CÓDIGO

Faz uso de algum outro suplemento?
(tratamento fitoterápico)

1

2

qual: _____
duração: _____

DADOS PRESSÃO ARTERIAL

Pressão Arterial Sistólica: _____ mmHg

Pressão Arterial Diastólica: _____ mmHg

DADOS BIOIMPEDANCIA CORPORAL (BIA)

% de Gordura Corporal: _____

Reactância (Xc): _____

Massa de Gordura Corporal: _____ Kg

Resistência (R): _____

Massa Magra Corporal: _____ Kg

GER: _____

TANITA

Peso: _____ Kg

% de Gordura Corporal: _____

Massa de Gordura Corporal: _____ Kg

Massa Magra Corporal: _____ Kg

GER: _____

METACHECK

Time (min)	RMR (Kcal/day)
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

RMR (Kcal/day): _____

Pred (Kcal/day): _____

% Above/Below: _____% __Above __Below

VO2 (ml/min): _____

VO2 (ml/min/kg): _____

FFM: _____ kg

C. CINTURA: _____ cm

COLETA DE SANGUE

2 tubos de EDTA

SIM NÃO

1

2

quantidade: _____

2 tubos de soro

1

2

quantidade: _____

1 tubo de heparina

1

2

quantidade: _____

OBSERVAÇÕES



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

PROJETO MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO

3º ENCONTRO (ENTREGA DOS INFORMES NUTRICIONAIS)

CÓDIGO

DIA:
HORA:

CONFERIR	SIM	NÃO
Devolução do R72H preenchido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Conferir R72H (Kit de medidas caseiras)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Devolução da bolsa com as unhas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

FINALIZAÇÃO

Entrega do informe nutricional (orientação do voluntário em relação ao seu estado nutricional)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
---	--------------------------	--------------------------

OBSERVAÇÕES

CÓDIGO **QUESTIONÁRIO ATIVIDADE FÍSICA**Quanto tempo você dedicou à prática das seguintes atividades no **último ano**? (complete a tabela abaixo)

	Nunca	Minutos/semana			Horas/semana						Meses/ano		
		1-4	5-19	20-59	< 1	1-1,5	2-3	4-6	7-10	≥11	<3	3-6	>6
Andar ou passear fora de casa													
Correr devagar													
Correr mais competitivo ou rápido													
Andar de bicicleta													
Bicicleta ergométrica ou spinning													
Nadar													
Tenis ou outro (raquete ou bastão)													
Futebol													
Equipe (volei, basquete)													
Dança de salão, aeróbica													
Escalada													
Ginástica													
Cuidar do jardim ou piscina													
Judo, Karate ou outras artes marciais													
Outras atividades não mencionadas													



CÓDIGO

QUESTIONÁRIO ATIVIDADE FÍSICA

Quanto tempo por dia você gasta realizando as seguintes atividades (**DIA TÍPICO DE TRABALHO / DIA DE SEMANA**)
(complete a tabela abaixo)

	Nunca	min/dia		horas/dia									
		<30	30-60	1	2	3	4	5	6	7	8	9+	
Assistindo TV													
Sentado na frente do computador													
Dirigindo													
Só sentado													
Dormindo													
Saindo com os amigos													
Indo a pé ao trabalho													
Realizando tarefas domésticas													
Realizando atividades mais intensas													

Quanto tempo por dia você gasta realizando as seguintes atividades (**DIA TÍPICO DE FINAL DE SEMANA**)?
(complete a tabela abaixo)

	Nunca	min/dia		horas/dia									
		<30	30-60	1	2	3	4	5	6	7	8	9+	
Assistindo TV													
Sentado na frente do computador													
Dirigindo													
Só sentado													
Dormindo													
Saindo com os amigos													
Indo a pé ao trabalho													
Realizando tarefas domésticas													
Realizando atividades mais intensas													

CÓDIGO **QUESTIONÁRIO TABAGISMO**

- Você já fumou 100 ou mais cigarros na sua vida?
- Não
- Sim e contínuo
- Sim, mas já parei

Caso tenha marcado a **2ª Opção (Sim e contínuo)** ou **3ª Opção (Sim, mas já parei)** responda:

Quantos cigarros por dia (em média) fumava ou fuma em determinada idade?

Idade	Cigarros/dia						
< 15 anos	<input type="checkbox"/> Nenhum	<input type="checkbox"/> 1 a 4	<input type="checkbox"/> 5 a 15	<input type="checkbox"/> 15 a 24	<input type="checkbox"/> 25 a 34	<input type="checkbox"/> 35 a 44	<input type="checkbox"/> 45 ou +
15 a 19 anos	<input type="checkbox"/> Nenhum	<input type="checkbox"/> 1 a 4	<input type="checkbox"/> 5 a 15	<input type="checkbox"/> 15 a 24	<input type="checkbox"/> 25 a 34	<input type="checkbox"/> 35 a 44	<input type="checkbox"/> 45 ou +
20 a 29 anos	<input type="checkbox"/> Nenhum	<input type="checkbox"/> 1 a 4	<input type="checkbox"/> 5 a 15	<input type="checkbox"/> 15 a 24	<input type="checkbox"/> 25 a 34	<input type="checkbox"/> 35 a 44	<input type="checkbox"/> 45 ou +
30 a 39 anos	<input type="checkbox"/> Nenhum	<input type="checkbox"/> 1 a 4	<input type="checkbox"/> 5 a 15	<input type="checkbox"/> 15 a 24	<input type="checkbox"/> 25 a 34	<input type="checkbox"/> 35 a 44	<input type="checkbox"/> 45 ou +

Caso tenha marcado a **3ª Opção (Sim, mas já parei)**, responda também:

- Há quanto tempo parou de fumar?
- < 1 ano
- 1 a 2 anos
- 3 a 5 anos
- 6 a 9 anos
- 10 ou + anos



INSTRUÇÕES PARA O PREENCHIMENTO DO REGISTRO DE 72 HORAS E COLETA DAS UNHAS

REGISTRO DE 72 HORAS

Você está recebendo três formulários para registrar todos os alimentos e/ou bebidas consumidos durante o período de 3 dias (72 horas) não consecutivos, sendo 2 dias da semana e um de final de semana (sábado ou domingo);

Indicar as datas e os dias da semana referentes ao seu registro;

O formulário é constituído de três colunas:

1ª) Hora: Anotar os horários nos quais foram consumidos todos os alimentos e/ou bebidas relatados;

2ª) Alimentos ou Bebida/Característica: Você deve anotar o tipo de alimentos e/ou bebida e todas as características possíveis:

No caso dos produtos industrializados, relate a marca e a quantidade;

No caso de preparações relate o tipo de preparação (cru, cozido, frito, assado, etc.);

Indique se o alimento ou bebida é integral, desnatado, light, diet, sem açúcar, etc.;

Indique se o alimento é pré-preparado (congelados);

3ª) Quantidade: Ao anotar as quantidades de alimentos e bebidas procure ser o mais exato possível, relatando as medidas caseiras (Ex.: colher de sopa, copo duplo, copo americano, prato fundo...) e/ou unidades (Ex.: 1 pão, 3 biscoitos água e sal, ½ copo, xícara, prato, etc.) conforme orientações recebidas;

Você não deve mudar os seus hábitos alimentares em função do registro;

Para evitar que se esqueça de registrar algum alimento ou bebidas, você deve anotá-los logo após a ingestão;

Não se esqueça de registrar os alimentos consumidos fora de casa;

Não se esqueça de registrar o que come fora das refeições principais (o que “belisca”). Exemplos: bala, chicletes, chocolate, bombons, salgadinhos, etc.;

Não se esqueça de registrar das bebidas alcoólicas;

Caso adicione açúcar, sal ou azeite aos alimentos ou bebidas, não se esqueça de registrar a quantidade

COLETA DAS UNHAS

Você está recebendo uma embalagem plástica, na qual deverá colocar as unhas coletadas;

As unhas dos pés e das mãos, previamente lavadas com água e sabão, devem ser cortadas;

Colocadas na embalagem, que em seguida deve ser fechada e entregue no próximo encontro;

No caso das mulheres, solicita-se que o esmalte seja retirado antes da coleta das unhas.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. **Título do Estudo:** Avaliação do estado oxidativo e inflamatório de uma população universitária: possível associação com o desenvolvimento de síndrome metabólica
2. **Local de Execução:** Universidade Federal de Viçosa - UFV, Departamento de Nutrição e Saúde - DNS, Laboratório de Metabolismo Energético e Composição Corporal – LAMECC
3. **Pesquisadores:**
Prof^ª Josefina Bressan, D.S. , DNS, UFV
Prof^ª Neuza Brunoro Costa, D.S. , DNS, UFV
Prof^ª Rita de Cássia G Alfenas, D.S. , DNS, UFV
Ana Carolina Pinheiro Volp, M.S., Doutoranda, DTA, UFV
Kiriaque Barra Ferreira Barbosa, M.S., Doutoranda, DTA, UFV

Contatos:

Telefones (24 Horas): 031 8783-1841/031 9775-6960

Telefone LAMECC (8:00 às 12:00 e 14:00 as 18:00): 031 38993388

email: projetonutricao@yahoo.com.br
4. **Objetivo do Estudo:** Investigar a estado inflamatório e de estresse oxidativo e associação com o desenvolvimento da síndrome metabólica em população universitária
5. **Critérios de Inclusão:**
 - Ter idade compreendida entre 18 e 35 anos
 - Não estar enfermo
 - Ser aluno de graduação ou pós-graduação da UFV
 - Não estar fazendo dieta ou participando de programa para controle de peso
6. **Critério de Exclusão:** Não cumprimento de algum dos critérios estabelecidos no item 5.
7. **Descrição do Estudo:**
 - Primeira Etapa: Aplicação de questionários para obtenção de informações relacionadas à alimentação e ao estilo de vida. Avaliações antropométricas não invasivas (peso, altura e circunferências). Será disponibilizada uma embalagem plástica para a coleta de unhas dos pés e das mãos, previamente limpas, que deverão ser entregues na próxima etapa.
 - Segunda Etapa: Avaliação da composição corporal por bioimpedância elétrica (método não invasivo, indolor, baseado na passagem de corrente elétrica, através do corpo, de muito baixa voltagem, a qual não causará nenhum dano à saúde). Aferição da pressão arterial. Extração de sangue.
 - Terceira Etapa: Orientações em relação aos resultados obtidos
8. **Benefícios:** Os participantes poderão conhecer e receber orientações quanto ao estado nutricional, antropometria e composição corporal, adequação do consumo alimentar e condições gerais de saúde: pressão arterial, níveis de colesterol e glicemia.

9. **Riscos:** O estudo não oferece riscos. Os equipamentos e materiais usados em todos os procedimentos serão estéreis e/ou descartáveis. Os participantes não serão submetidos a nenhum tipo de intervenção que possa causar danos à saúde, visto que todos os procedimentos adotados são inócuos e têm respaldado na literatura científica.
10. **Privacidade:** Os resultados do estudo serão publicados, sem citação dos nomes envolvidos, havendo total proteção à participação dos indivíduos. Os resultados poderão estar disponíveis para a Agência Financiadora da Pesquisa, observando a privacidade dos nomes envolvidos.
- Eu entendo que minha participação é voluntária e posso recusar-me a participar ou posso interromper minha participação em qualquer hora, sem penalização.
 - Minha participação neste estudo não implica em contrato de trabalho.
 - Fui comunicado da inocuidade de todos os procedimentos realizados neste estudo, assim qualquer enfermidade que surja durante o estudo, deverá ser tratada por conta própria, ou seja, o estudo que participo não assume nenhum compromisso no tratamento da mesma. Nestes casos, deverei comunicar à equipe do projeto todas as informações referentes à enfermidade e o seu tratamento e não poderei mais participar do estudo
 - Eu não receberei qualquer compensação financeira para participar do estudo.
 - Se existir alguma intercorrência decorrente da pesquisa, poderei me comunicar com os pesquisadores através dos telefones: 031 8783-1841 ou 031 9775-6960, em qualquer horário do dia ou da noite.
 - Fui esclarecido em relação a todos os procedimentos que serão realizados neste estudo. Minhas dúvidas foram respondidas. Eu entendo que perguntas adicionais relacionadas ao estudo devem ser dirigidas aos investigadores listados acima. Eu entendo que, se tenho dúvidas sobre direitos dos voluntários, posso contatar o Comitê de Ética da UFV. Eu concordo com os termos acima e acuso o recebimento de uma cópia deste consentimento.

Viçosa, ____ de _____ de 2008.

Voluntário

Testemunha

Pesquisador