UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Recebido em 23/05/00
Lilacs

Lilacs OK

" ESTRESSE OXIDATIVO E ENVELHECIMENTO "

SANDRA CASTRO POPPE

Tese de Doutorado

ORIENTADOR

Prof^a. Dr^a Virgínia Berlanga Campos Junqueira

**SÃO PAULO
2001**

INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
20.099
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

" ESTRESSE OXIDATIVO E ENVELHECIMENTO"

SANDRA CASTRO POPPE

Tese de Doutorado

ORIENTADOR

Prof.^a Dr.^a Virgínia Berlanga Campos Junqueira

**SÃO PAULO
2001**

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004745

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Poppe, Sandra Castro
P831e Estresse oxidativo e envelhecimento / Sandra Castro
Poppe. -- São Paulo, 2001.
175p

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Junqueira, Virgínia Berlanga Campos

I. Bioquímica teórica I. T. II. Junqueira, Virgínia
Berlanga Campos, orientador.

574.19282 CDD

"Estresse Oxidativo e Envelhecimento"

SANDRA CASTRO POPPE

*Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.*

Aprovada por:

Profa. Dra. VIRGINIA BERLANGA CAMPOS JUNQUEIRA
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. PIO COLEPICOLA NETO
IQ - USP

Profa. Dra. ANA CAMPA
FCF - USP

Profa. Dra. DULCINÉIA SAES PARRA ABDALLA
FCF - USP

Prof. Dr. LUIZ ROBERTO RAMOS
UNIFESP

**SÃO PAULO
10 DE AGOSTO 2001.**

Aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado, cujos esforços tornaram este trabalho possível. A minha eterna e sincera gratidão.

*À minha grande irmã e amiga, pelo seu entusiasmo contagiante.....
e ao Dr. Feijão, singular....sempre.*

Ah! À Matilda, Ramirez e aos outros que já se foram, pelo amor incondicional.

***Ao meu companheiro de grandes aventuras, que mais uma vez me
surpreendeu,
te amo.***

Ví
“O melhor amigo é aquele que nos faz melhores do que somos. Que nos ajuda a enfrentar as situações difíceis e a não desperdiçar as oportunidades da vida”.

Agradecimentos

À Prof.^a Dr.^a Virginia Berlanga Campos Junqueira, meus sinceros agradecimentos por toda a orientação e pela valiosa oportunidade de trabalhar em seus laboratórios.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Ramos, por ter acreditado nos "*free radicals*".

Aos idosos do EPIDOSO, que participaram incondicionalmente do projeto; este trabalho é para vocês.

Aos Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S/A e Viternat Laboratórios Ltda, pelo fornecimento gratuito das vitaminas e placebos deste estudo.

Aos meus amigos de laboratório, Karin Simon Giavarotti, Leandro Giavarotti, Lígia Azzalis, Sandra Chan, Lígia Ferreira Gomes, André Fonseca, Paula Knox, Alcione V. Moscardi, Vaní G. Sree e Regina Catarino, obrigada por estarem presentes em todos os momentos, dando-me força; obrigada pelas lágrimas, risadas e fofocas.

Alessandra Ferreira Lima e Alessandro De Grande, vocês foram incríveis nesta etapa.

À "casinha" da Geriatria, que sempre me acolheu carinhosamente. Um obrigado especial à Vera e à Rosa.

Ao Prof. Dr. Clineu de Mello Almada Filho, meu companheiro de projeto, meus agradecimentos pela interação dos dados.

Aos funcionários da UNIFESP, pelo auxílio, dedicação e carinho mostrado durante todo este tempo.

Aos amigos do laboratório Vitæ, pelo auxílio técnico-científico, na análise das vitaminas.

Aos meus amigos do Instituto de Química/USP... saudades do bloco 12. Às amigas conquistadas, que jamais se perderão. Tati, Tona, Ilda e à mais nova integrante, Adriana Miranda Carvalho.

Aos docentes, colegas de pós-graduação, estagiários e funcionários do Instituto de Química, pelo auxílio e amizade.

À equipe da pós-graduação do IQ-USP, pelo auxílio e atenção, prestada em todos estes anos.

Dona Vitória, não poderia esquecer de agradecê-la pelos seus cuidados.

Ao Dr. Clóvis A. Peres e Alexandre Shinzato, pelo auxílio durante a análise estatística.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e à FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos a todos que se fizeram presentes voluntariamente no desenvolvimento desta tese.

Resumo

Este trabalho enfatiza o estabelecimento de parâmetros relacionados ao estado de estresse oxidativo em uma população de idosos, avaliando-se: níveis de antioxidantes de baixo peso molecular no plasma, vitC, α TC e β CT assim como a sua ingestão alimentar diária; atividade das enzimas antioxidantes eritrocitárias (CuZn-SOD, CAT e GPX) níveis de produtos derivados da oxidação de lipídios, mais especificamente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT) e a atividade do *burst* oxidativo em neutrófilos sangüíneos

Foram estudados 90 idosos, residentes na comunidade, com idade igual ou superior a 65 anos, selecionados a partir de uma sub-amostra do projeto EPIDOSO sob acompanhamento regular no Centro de Estudos do Envelhecimento da Universidade Federal de São Paulo. Os parâmetros acima foram comparados aos de uma população adulta jovem saudável (40-49 anos).

A ingestão alimentar diária de vitC, vitE e β CT, na população idosa é bastante superior em relação ao grupo de adultos jovens e, também, superior às RDA (recomendações dietéticas diárias). Isto, provavelmente, se deve à orientação clínica e nutricional a que esta população idosa vem sendo submetida, ao longo do tempo. Este dado reforça a importância de um acompanhamento clínico sistemático e diferenciado para o indivíduo idoso.

Apesar da adequada ingestão diária de antioxidantes, pela dieta, as concentrações plasmáticas encontradas não se correlacionam com a ingestão, e são inferiores, às concentrações plasmáticas encontradas na população de adultos jovens. Estes resultados indicam que, uma dieta ainda que equilibrada e adequada, não proporciona, concentrações plasmáticas de antioxidantes em idosos, adequadas para controlar a atividade de espécies oxidantes. Estas baixas concentrações plasmáticas de vitC, α TC e β CT, encontradas nos idosos, podem ser atribuídas à diferenças na absorção, distribuição e biodisponibilidade destes antioxidantes, próprias do envelhecimento. A atividade específica das enzimas antioxidantes são superiores às da população de jovens. Além disso, os parâmetros oxidativos são maiores na população idosa, reforçando a idéia do estresse oxidativo presente no envelhecimento.

Esses idosos (90) foram submetidos a uma suplementação vitamínico-mineral diária de 800mg de α TC, 15mg de β CT, 2g de vitC e 100 μ g de selênio, para observarmos modificações nos parâmetros oxidantes. O estudo de suplementação, randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, foi desenhado da seguinte forma: os idosos foram divididos em 2 grupos de tratamento, T1 e T2, onde T1 recebeu inicialmente a suplementação vitamínico-mineral (100 dias) e, depois do período de *washout* (período em que os parâmetros medidos retornam para os valores basais) recebeu suplementação com placebo (100 dias). O tratamento T2 apresentou desenho inverso (*cross-over*) ou seja, recebeu a suplementação placebo nos primeiros 90 dias e nos últimos 90 dias recebeu a suplementação vitamínico-mineral.

A análise dos resultados após a suplementação vitamínico-mineral demonstra, para T1 e para T2, um aumento nas concentrações plasmáticas de antioxidantes acompanhado de uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes implicando, possivelmente, uma resposta adaptativa da célula. Os parâmetros oxidativos determinados (SRAT e *burst* oxidativo de neutrófilos) diminuíram com a suplementação.

Abstract

This work emphasizes the setting of oxidative stress-related parameters in a population of aged individuals, evaluating: plasmatic levels of low molecular weight antioxidants, vitamin C, α -tocopherol (α TC) and β -carotene (β CT) as well as their daily intake; activity of erythrocyte antioxidant enzymes (CuZnSOD, CAT and GPX); lipid oxidation-derived products, more specifically thiobarbituric acid-reactant substances, and blood neutrophil oxidative burst activity.

We studied 90 aged subjects living in the community, with ages 65 or more, selected from a subsample of EPIDOSO project under regular supervision by the Centro de Estudos do Envelhecimento of Universidade Federal de São Paulo. The parameters above mentioned were compared to those of a healthy young adult population.

The daily intake of vitC, vitE and β CT of the aged population is well above that of young adults, and also above the RDA. This is probably due to the clinical and nutritional orientation that has been offered to this aged group. This fact attests to the importance of systematic and specific clinical counseling to the elderly.

Despite the proper daily intake of antioxidants, the plasmatic concentrations of these antioxidants do not correlate to their intake, being lower than the plasmatic concentrations in young adults. These results suggest that even a balanced and adequate diet is not enough, in the elderly, to promote the plasmatic antioxidant concentration needed to control the activity of oxidant species. These low plasma levels of vitC, vitE and β CT in the elderly can be attributed to changes in absorption, distribution, and bioavailability of these antioxidants, which are common in the aging process. The specific activities of the antioxidant enzymes are higher than those of the younger population. Additionally, the oxidative parameters are higher in the aged group, supporting the idea that oxidative stress is involved in the aging process.

These aged subjects received a vitamin-mineral supplementation (800 mg α TC, 15 mg β CT, 2g vitC and 100 μ g selenium) aiming to modify the oxidative parameters. The randomized, double blind and placebo-controlled supplementation study was thus designed: the aged subjects were divided in 2

treatment groups, T1 and T2, where T1 received, first the vitamin-mineral supplementation (100 days) and then, after a washout period, a placebo treatment (100 days). The T2 group received the same treatment, but in inverse order (cross-over).

The result analysis shows an increase in the plasmatic antioxidant concentrations in both treated groups, as well as a decrease in the activities of the antioxidant enzymes, hinting to an adaptive cellular response. The supplementation also decreased the assessed oxidative parameters (SRAT and neutrophil oxidative burst).

Abreviaturas

AMP : Adenosina monofosfato

α TC : α -tocoferol

ATP : Adenosina trifosfato

β CT : Beta-caroteno

CAT : Catalase

cGMP : Guanosina monofosfato cíclico

CuZnSOD : Superóxido dismutase cobre e zinco dependente

DAG : Diacilglicerol

DHA : Deidroascorbato

DMSO : Dimetilsufóxido

DNA : Ácido desoxirribonucléico

DP : Desvio padrão

EDTA : Ácido etileno diaminotetra acético

ERO/ERN : Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

FAPyG : 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina

FeSOD : Superóxido dismutase ferro dependente

fMLP : Peptídeo sintético N-formil-metionil-fenilalanina

GPx : Glutathione peroxidase

GSH : Glutathione reduzida

GSNO : Nitrosotiol

GSSG : Glutathione oxidada

GTP : Guanosina trifosfato

Hb : Hemoglobina

HDL : Lipoproteína de alta densidade

HPLC : Cromatografia líquida de alta eficiência

IDL : Lipoproteínas de densidade intermediária

iNOS : NO sintase induzida

IP₃ : Inositol trifosfato

LDL : Lipoproteínas de baixa densidade

MAP quinase : proteína quinase ativadas por mitógenos

MDA : Malonildialdeído ou malondialdeído

MnSOD : Superóxido dismutase manganês dependente

MPO : Mieloperoxidase

mtDNA : DNA mitocondrial

NADH : Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADPH : Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NOS : NO sintase

ONOO⁻ : Peroxinitrito

PBS : Tampão de fosfato sódio

PKC : Proteína quinase C

PLTP : Proteína plasmática transferidora de lipídio

PMA : Acetato de forbol miristato

PMN : Polimorfonucleares

QL : Quimioluminescência

RDA : Recomendações dietéticas diárias

SOD : Superóxido dismutase

SRAT : Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBA : Ácido tiobarbitúrico

t-BOOH : Peróxido de ter-butila

TCA : Ácido tricloroacético

TNF α : Fator de necrose tumoral α

TRX : Tireodoxina

VitE : Vitamina E

VitC : Vitamina C

VLDL : Lipoproteína de muito baixa densidade

UV : Radiação ultravioleta

Zy : Zimosan

Índice

1. Introdução

1.1. Envelhecimento.....	1
1.1.1. Teorias do envelhecimento programado.....	2
1.1.2. Teorias do envelhecimento baseadas em eventos aleatórios.....	5
1.2. Radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN).....	12
1.3. Alvos moleculares das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	18
1.4. Defesa antioxidante.....	26
1.4.1. Antioxidantes enzimáticos	27
1.4.2. Antioxidantes não-enzimáticos.....	30
1.4.2.1. Compostos hidrossolúveis de baixo peso molecular.....	30
A – Glutathione (GSH).....	30
B – Ácido ascórbico (Vitamina C).....	31
1.4.2.2. Compostos lipossolúveis de baixo peso molecular.....	33
A – Tocoferóis	33
B – Ubiquinona.....	37
C – Carotenóides.....	38
1.4.3. Cooperação <i>in vivo</i> do sistema de defesa antioxidante.....	40
1.5. <i>BURST</i> oxidativo de neutrófilos humanos.....	43
1.5.1. Neutrófilos e ativação da NADPH oxidase.....	43
1.5.2. Mecanismos de sinalização envolvidos na ativação da NADPH oxidase.....	46
1.5.2.1. Ativação da cascata de sinalização através da ligação ao receptor, mediada por proteínas G.....	48
1.5.2.2. Efeitos do α -tocoferol em PMN e macrófagos.....	50

1.6. Estresse Oxidativo e Envelhecimento	52
2. Objetivos	65
3. Materiais e Métodos	
3.1. Desenho do Estudo.....	66
3.1.1. Casuística.....	67
3.2. Inquérito clínico.....	69
3.3. Inquérito nutricional	70
3.4. Inquérito laboratorial	70
3.4.1. Tratamento e coleta das amostras de sangue	70
3.4.2. Medida de parâmetros de estresse oxidativo.....	71
3.4.2.1. Avaliação das enzimas antioxidantes eritrocitárias.....	71
A – Preparo do hemolisado.....	71
B – Dosagem de Hemoglobina.....	71
C – Determinação da atividade das enzimas antioxidantes.....	72
Cu,Zn-Superóxido dismutase	72
Catalase	73
Glutathione peroxidase.....	73
3.4.2.2. Avaliação de antioxidantes de baixo peso molecular.....	74
A – Medida da concentração plasmática de α -tocoferol e β -caroteno.....	74
Preparo dos padrões.....	74
Determinação de α -tocoferol e β -caroteno.....	75
B – Medida da concentração plasmática de vitamina C.....	77
3.4.2.3. Medida da concentração de substâncias reativas ao ácido	

tiobarbitúrico (SRAT) no plasma.....	78
3.4.2.4. Avaliação do burst oxidativo de neutrófilos sangüíneos humanos,	
medida por quimioluminescência (QL) amplificada por luminol.....	79
A – Obtenção dos neutrófilos	79
B – QL de neutrófilos amplificada por luminol.....	80
C – Preparo do zimosan.....	81
D – Preparo do luminol.....	82
E – Ensaio	82
3.5. Análise estatística.....	83
 4. Resultados	
4.1. Inquérito nutricional.....	84
4.2. Avaliação dos níveis plasmáticos de antioxidantes de baixo peso	
molecular.....	85
4.3. Correlação entre níveis plasmáticos e ingestão de antioxidantes	
da população idosa.....	86
4.4. Atividade específica das enzimas eritrocitárias antioxidantes.....	86
4.5. Níveis plasmáticos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	87
4.6. Correlação entre níveis plasmáticos de antioxidantes e atividade	
do <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos sangüíneos da população idosa.....	88
4.7. Avaliação da suplementação vitamínica na população idosa.....	89
4.7.1. Teste de consistência dos valores iniciais das concentrações	
plasmáticas dos antioxidantes.....	89
4.7.2. Níveis plasmáticos de antioxidantes de baixo peso molecular	
antes e depois da suplementação.....	90

4.7.3. Atividade das enzimas antioxidantes eritrocitárias antes e depois da suplementação.....	92
4.7.4. Concentrações plasmáticas das SRAT antes e depois da suplementação.....	94
4.7.5. <i>Burst</i> oxidativo de neutrófilos antes e depois da suplementação.....	95
4.7.5.1. Velocidade de produção de ERO/ERN medida por QL amplificada por luminol.....	95
4.7.5.2. Produção de ERO/ERN medida por QL amplificada por luminol.....	96
4.7.6. Inquérito nutricional: valores de ingestão diária de antioxidantes obtidos antes e após a suplementação.....	97
 5. Discussão	
5.1. Avaliação do status oxidativo da população idosa.....	99
5.1.1. Descrição da população estudada.....	99
5.1.2. Inquérito nutricional.....	99
5.1.3. Inquérito laboratorial.....	101
5.1.3.1. Avaliação dos níveis plasmáticos de antioxidantes de baixo peso molecular.....	102
5.1.4. Correlação entre níveis plasmáticos e ingestão de antioxidantes de baixo peso molecular na população idosa.....	104
5.1.5. Atividade específica de enzimas eritrocitárias antioxidantes.....	105
5.1.6. Níveis plasmáticos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	109
5.1.7. Correlação entre níveis plasmáticos de antioxidantes e atividades do burst oxidativo de neutrófilos sangüíneos da população idosa.....	109
5.2. Avaliação de suplementação vitamínica na população idosa.....	111

5.2.1. Níveis plasmáticos de antioxidantes de baixo peso molecular	
efeito da suplementação.....	111
5.2.2. Atividade das enzimas antioxidantes eritrocitárias: efeito da	
suplementação.....	116
5.2.3. Concentrações plasmáticas de SRAT antes e depois da	
suplementação.....	118
5.2.4. BURST oxidativo de neutrófilos antes e depois da suplementação.....	120
 6. Conclusões.....	 124
 7. Referências Bibliográficas.....	 125
 8. Anexos.....	 168

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Envelhecimento

O envelhecimento é parte do processo de desenvolvimento dos organismos vivos. Caracteriza-se por perda progressiva da capacidade de adaptação fisiológica do indivíduo ao seu meio ambiente, culminando com a sua morte (ROWLATT & FRANKS, 1975). É um processo biológico fundamental que ocorre em virtualmente todos os organismos; apenas aqueles organismos que não param de crescer após alcançar a idade adulta, como exemplificado por diversos tipos de peixes e répteis, não envelhecem. Nem por isso os mesmos são imortais, podendo, assim como os animais que envelhecem, morrer de doenças, acidentes ou predação.

A biologia evolutiva postula que o envelhecimento seria um processo inevitável devido a diversos comprometimentos do organismo (KIRKWOOD, 1992; KIRKWOOD, 1994; WILLIAMS, 1991). Um deles seria que uma considerável proporção dos recursos de qualquer animal é direcionado à reprodução, às custas da manutenção dos tecidos somáticos, o que quer dizer que esta manutenção é menor do que a que seria necessária à sobrevivência indefinida. De qualquer maneira, na natureza, a morte por predação, doenças ou acidentes acontece bem antes que qualquer processo de senescência, sendo, portanto, improvável que qualquer população selvagem seja selecionada pela sua capacidade de envelhecer mais lentamente. Outro comprometimento é que a natureza seleciona vários genes úteis para a sobrevivência imediata, mas que podem ter consequências deletérias a longo prazo. O *burst* oxidativo das células fagocíticas, por exemplo, protege contra o ataque de vírus e bactérias, mas contribui para a

produção de lesão DNA, mutação e câncer (WEITZMAN & GORDON,1990; COHEN *et al.*,1991).

As teorias mais aventadas sobre a natureza do processo de envelhecimento são muitas e seu número aumenta à medida que novos resultados experimentais são relatados. A existência de várias teorias é um indicativo da dificuldade de se estabelecer uma única razão para o processo de envelhecimento (SCHNEIDER,1987). Os organismos passam por inúmeras mudanças à medida que envelhecem e uma parte da dificuldade em se estabelecer uma causa para o envelhecimento está, justamente, no fato que é impossível selecionar, entre estas mudanças, as que são causa e as que são consequência do processo.

Pode-se sugerir que as teorias do envelhecimento encontram-se divididas em dois grupos: as que assumem um plano programado antecipadamente e as que estão baseadas em eventos aleatórios (HAYFLICK,1998). No primeiro caso, haveria um relógio biológico baseado em eventos químicos e/ou físicos que determinaria o tempo de vida de cada espécie. No segundo, o envelhecimento seria resultado de uma série de eventos aleatórios, acidentais, não programados, como erros em moléculas importantes, por exemplo, o ácido desoxirribonucléico (DNA).

1.1.1. Teorias do envelhecimento programado

Várias das teorias modernas têm suas raízes em épocas antigas, como a “teoria da substância vital”, na qual a idéia inicial é que os animais começam suas vidas com uma quantidade limitada de alguma substância indispensável à vida, que vai sendo consumida ao longo do tempo e que, quando termina, leva o

animal à morte. Apesar da idéia ser antiga, pesquisadores da atualidade argumentam que esta substância vital poderia ser o DNA de genes essenciais, presentes em células que não se dividem e que vão se perdendo com o passar do tempo (STREHLER, 1986).

Com as descobertas sobre a participação dos telômeros (extremidades dos braços do cromossomo) no processo de envelhecimento, poderíamos relacionar a substância vital a estas estruturas cuja função ficou, por muito tempo, desconhecida. De acordo com a hipótese telomérica da senescência, o encurtamento dos telômeros, que acompanha a replicação das células somáticas normais, agiria como um relógio biológico mitótico que estaria relacionado ao envelhecimento e à morte (LEVY *et al.*, 1992). Mais recentemente, HAYFLICK (1998) sugeriu que as células normais são mortais porque os telômeros encurtam a cada divisão celular e como estas células têm capacidade limitada de divisão, possivelmente, as mudanças que ocorrem com o envelhecimento devem ocorrer intracelularmente.

Uma outra teoria, com pouca comprovação científica, é a da “exaustão reprodutiva”, que sugere que após um surto de atividade reprodutiva, um animal ou planta começa a envelhecer e morre rapidamente. Fatores que servem de evidência para esta teoria ocorrem em alguns peixes, moluscos, algumas flores e plantas. Entretanto, muitos animais, inclusive o homem, se reproduzem várias vezes, em diferentes épocas da vida, sem que haja relação com o envelhecimento ou morte. É necessário ressaltar, também, que no caso da exaustão reprodutiva, falta universalidade às bases da teoria, o que é essencial para se estabelecer uma razão para o envelhecimento.

Dentre as teorias de envelhecimento como evento programado, a idéia do programa genético proposital começou a ser desenvolvido em 1908, por Charles S. Minot (HAYFLICK, 1996). O autor postulou que o envelhecimento começa no nascimento e que é, simplesmente, uma continuação do desenvolvimento biológico, que encontra-se programado em nossas células no momento da concepção. Em 1975, Cutler continuando a desenvolver esta idéia, concluiu que o processo de envelhecimento, assim como a diferenciação e o desenvolvimento, estão sob controle genético, ou seja, os organismos possuem genes que codificam o programa de envelhecimento de cada um.

O conhecimento que existem doenças que levam ao envelhecimento prematuro também favorece a teoria do controle genético (MEDINA, 1996). Em síndromes como a de Werner e a Progeria os pacientes apresentam sinais de envelhecimento na época da puberdade, ou mesmo antes dela (S. Hutchinson-Gilford). Os pacientes portadores destas síndromes, entretanto, não apresentam todos os sinais que aparecem no envelhecimento normal; mas, o fato destas síndromes existirem, servem para demonstrar que os genes desempenham um papel muito importante no processo de envelhecimento.

A idéia da programação prévia para o envelhecimento ganha apoio com o conhecimento que nossas células possuem um sistema de morte programada, ou suicídio celular, chamada apoptose, onde existem genes capazes de transmitir informações às células para que envelheçam e morram, funcionando não só durante o processo de desenvolvimento, mas em muitas outras situações, como no estresse e em algumas condições patológicas (ASHKENAZI & DIXIT, 1998; THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998; GREEN & REED, 1998; ADAMS & CORY, 1998).

A teoria neuroendócrina sugere que as alterações associadas à idade são causadas pelos hormônios ou, pela falta destes (ROSE, 1994; HAYFLICK, 1996). Os hormônios regulam muitas atividades relacionadas ao metabolismo, reprodução, síntese protéica, função imunológica, crescimento e comportamento e, reconhecidamente, têm a capacidade de acelerar alguns processos de envelhecimento e retardar outros. Entretanto, apesar de todos os efeitos que o sistema neuroendócrino exerce sobre os organismos, não há indícios diretos de que esteja nele a origem de todas as mudanças associadas à idade. Além disso, nem todos os animais que envelhecem apresentam os sistemas neuroendócrinos complexos observados nos vertebrados superiores, o que contribui contra a universalidade desta teoria e, a enfraquece.

Convém ressaltar, no entanto, que algumas destas teorias dão ao DNA o controle total do processo, o que parece improvável, visto que todos os organismos estão sujeitos a interações com o ambiente e é muito difícil conceber que este não tenha nenhuma influência no processo de envelhecimento (BARNETT *et al.*, 1995).

1.1.2. Teorias do envelhecimento baseadas em eventos aleatórios

A maioria das teorias discutidas a seguir consideram que o envelhecimento ocorre devido a acontecimentos aleatórios que resultam em um acúmulo de erros e danos. A capacidade de lidar com estes erros, corrigindo-os, dá aos organismos uma viabilidade que vai diminuindo com o passar do tempo, levando-os à senescência e à morte.

A teoria do desgaste, é uma das primeiras teorias científicas do envelhecimento, descrita em 1882 por Weismann e postula que a morte ocorre

porque os organismos não podem se renovar constantemente (HAYFLICK, 1996). Assim, eles vão acumulando danos que ocorrem, aleatoriamente, com o passar do tempo e que acabam tornando o organismo inviável. Essa teoria, apesar de antiga, ainda mostra-se plausível e foi aprimorada por outros autores, nas quais os causadores dos danos são identificados, como é o caso da teoria dos radicais livres.

Outra teoria proposta é a teoria do sistema imunológico, baseada em duas grandes descobertas. Com a idade, a capacidade do sistema imunológico em produzir anticorpos em número adequado e específico, diminui (HIJMANS *et al.*, 1984). Além disso, o sistema imunológico em processo de envelhecimento pode produzir incorretamente anticorpos contra antígenos próprios levando às doenças auto-imunes (HIJMANS *et al.*, 1984; MANOUSSAKIS *et al.*, 1990; ASHOK & ALI, 1998). Como resultado destes dois fatores (sistema imunológico menos eficiente e produção de auto-anticorpos) os organismos tornam-se mais propensos a adquirir e manifestar doenças (SCHULLER *et al.*, 1981, XAVIER *et al.*, 1995). O ponto fraco desta teoria está no fato que os organismos inferiores não têm sistema imunológico bem desenvolvido, mas também envelhecem. Também é importante ressaltar que a diminuição da função imunológica está, geralmente, associada ao estabelecimento de doenças, e não necessariamente ao envelhecimento (MEDINA, 1996).

A teoria dos erros e reparos, que procura explicar o processo de envelhecimento como resultante do acúmulo progressivo de erros na síntese protéica, é bastante atrativa por sua universalidade, já que erros ocorrem em moléculas que compõem todas as células do organismo, em todas as espécies (ORGEL, 1963). Essa linha de interpretação assume que esse processo encontra-

se associado à capacidade que o organismo tem de reparar possíveis erros no DNA, uma vez que esta molécula possui um importante papel na síntese protéica. Apoio para esta teoria pode ser encontrado no fato que células retiradas de animais com maior longevidade têm maior capacidade de reparar, com eficiência, seu DNA danificado. Assim, os animais que vivem mais devem ter desenvolvido métodos mais eficientes para corrigir os erros em suas moléculas de DNA (WEIRICH-SCHWAIGER *et al.*, 1994; CUTLER, 1992). O processo de radiação, sabidamente aumenta o número de mutações e acelera o processo de envelhecimento em animais de experimentação, fato que vem a corroborar com essa teoria (KING *et al.*, 1994; SIMIC & BERGTOLD, 1991; HAYFLICK, 1996).

A teoria do envelhecimento por radicais livres (HARMAN, 1956) propôs que o envelhecimento resultaria do dano aleatório aos tecidos por radicais livres. Esta teoria foi apoiada por experimentos que demonstraram um aumento em alguns indicadores de envelhecimento, após a geração de espécies radicalares por exposição de corpo inteiro à raios X. Sabe-se que muitas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN) não são radicais livres, como por exemplo H_2O_2 , HOCl e $ONOO^-$. Portanto, talvez a teoria de Harman devesse ser renomeada como teoria do dano oxidativo no envelhecimento.

Em 1981, Harman sugeriu uma única causa para o envelhecimento, modificada por fatores genéticos e ambientais e que, os radicais livres estariam envolvidos tanto no envelhecimento como em doenças, ou ainda, em alterações relacionadas com a idade. Essa teoria continua sendo bastante aceita uma vez que radicais livres são produzidos constantemente durante o metabolismo normal dos organismos aeróbios. Além disso, a defesa antioxidante não protege completamente contra o dano constante causado por estas espécies às

macromoléculas. Portanto, este dano cumulativo com a idade poderia provocar mudanças no organismo. Estas mudanças seriam responsáveis, ou estariam associadas com a suscetibilidade sempre crescente à doença e à morte.

Muitos trabalhos corroboram a proposta da participação de ERO/ERN no processo de envelhecimento (HOLMES *et al.*, 1992). Foi demonstrado que o declínio das alterações morfofuncionais dos tecidos com a idade, poderia levar a uma produção aumentada de ERO/ERN. Experimentos realizados com partículas sub-mitocondriais isoladas de tecidos de ratos velhos produziram mais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) do que as de ratos jovens, sugerindo um transporte de elétrons menos eficiente com a idade (FLOHE, 1982; SOHAL & WEINDRUCH, 1996). Também foi demonstrada a existência de uma correlação inversa entre as taxas metabólicas basais dos animais e suas expectativas de vida. Em geral, os animais maiores consomem menos O_2 por unidade de massa corpórea do que os menores e, vivem mais. Experimentos que impediam moscas dosméticas de voarem através da remoção de suas asas, ou por confiná-las em pequenas garrafas, produziram aumento marcante na expectativa de vida. A restrição calórica em roedores foi associada à níveis decrescentes de dano oxidativo ao DNA, lipídios e proteínas, com o aumento da capacidade de reparo ao DNA e com uma diminuição na produção de $O_2^{\bullet-}$ por partículas sub-mitocondriais isoladas (SOHAL & WEINDRUCH, 1996).

CUTLER (1985) sugeriu que espécies de vida longa possuem mecanismos de proteção antioxidante melhores em relação às velocidades de consumo de O_2 , o que espécies de vida curta. Por exemplo, as atividades da superóxido dismutase (SOD) em diferentes mamíferos se correlacionam com a taxa metabólica multiplicada pela expectativa máxima de vida da espécie. Portanto, a

atividade da SOD em fígado humano, expressa em unidade de taxa metabólica, é mais alta do que aquela para outras espécies de primatas e, muito mais alta, do que aquela de outros mamíferos. Isto não quer dizer que os níveis absolutos de antioxidantes sejam mais altos em tecidos humanos. A correlação é com a atividade antioxidante por unidade de taxa metabólica. Foi sugerido que uma mudança na regulação gênica tenha permitido síntese de moléculas de SOD, relativamente mais altas, contribuindo para a longevidade.

Em publicações subseqüentes, Harman focalizou as mitocôndrias como geradoras de ERO, assim como alvo chave da lesão (HARMAN, 1972, 1981) propondo que alterações mitocondriais teriam um importante papel no envelhecimento. Estas alterações seriam o resultado de danos causados por espécies oxidantes geradas na mitocôndria durante a respiração, responsáveis pela senescência e diminuição da população mitocondrial (HARMAN, 1972). NOHL & HEGNER (1978) observaram aumento nas quantidades de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 produzidas pela mitocôndria durante a respiração, com a idade. Esta produção foi acompanhada de uma diminuição da capacidade da mitocôndria de sobreviver a um insulto hipóxico e de diminuição da fosforilação oxidativa. Adicionalmente, sabe-se que, mitocôndrias de ratos jovens, ao serem submetidas a sistemas geradores de radicais livres, não apenas desenvolvem o mesmo padrão de defeitos bioenergéticos das mitocôndrias de ratos idosos, mas também, tornam-se potentes geradores de radicais por si mesmas, acelerando seu próprio dano funcional (NOHL *et al.*, 1978).

Assim, a teoria mitocondrial do envelhecimento foi aventada por muitos pesquisadores (MIQUEL *et al.*, 1980; FLEMING *et al.*, 1982; MIQUEL & FLEMING, 1984) sugerindo que o DNA mitocondrial (mtDNA) seja o alvo primário

do ataque oxidativo, por ser mais vulnerável que o DNA nuclear, por não contar com cromatina ou com sistema de reparo eficiente (CHUNG *et al.*, 1992) e/ou pela proximidade do mesmo aos oxidantes, gerados durante a fosforilação oxidativa. Estudos concomitantes, demonstraram que o mtDNA é mais suscetível ao ataque das ERO apresentando mais de dez vezes o nível de dano oxidativo que o DNA nuclear, em fígado de rato (RICHTER *et al.*, 1988). Os danos ao mtDNA causam mudanças estruturais na molécula como bases modificadas (RICHTER, 1995) levando à alterações na replicação e na eficiência de seu sistema de reparo (FUKANAGA & YEDING, 1979). Além das injúrias ao mtDNA, as ERO iniciam a cadeia de peroxidação de lipídios da membrana interna da mitocôndria (BAGCHI *et al.*, 1995; RICHTER, 1995) causando modificações estruturais da membrana. Estas modificações levariam a diminuição de sua fluidez (MIQUEL & FLEMING, 1986) podendo alterar a atividade de enzimas mitocondriais e, concomitante declínio na produção de energia.

Mais recentemente, evidências experimentais têm indicado que a mitocôndria desenvolve um "*status*" de estresse oxidativo durante o envelhecimento, produzindo ERO/ERN, induzindo dano no mtDNA e inativando proteínas específicas, tais como a translocase nucleotídeo adenina. Estes eventos levam à disfunções mitocondriais como a incapacidade de manter o potencial de membrana e, a síntese de ATP. A mitocôndria disfuncional libera $O_2^{\bullet-}$, Ca^{2+} e citocromo c para o citosol, ativando a via de sinalização para a apoptose, via proteínas caspases. Pode-se também ativar lisossomos primários responsáveis pela digestão da organela (BOVERIS *et al.*, 2001; RIELD, 2001).

WEI (1998) também relacionou os eventos acima com os processos de envelhecimento, carcinogênese e doenças degenerativas relacionadas com a idade.

Um estudo mais atual, de longevidade e sistema de defesa antioxidante entre diferentes espécies de vertebrados, sugeriu características presentes nas espécies mais longevas: uma eficiência no sistema de reparo ao DNA e baixa produção de ERO/ERN nos locais próximos desta macromolécula (PEREZ *et al.*, 1998).

Atualmente muitos trabalhos têm atribuído ao óxido nítrico (NO) e seus produtos metabólicos papel no envelhecimento. McCANN *et al.* (1998) postulou um mecanismo importante por alterações celulares que conduziria à sua senescência e morte. O NO produzido pela iNOS (ativada por estímulos microbianos, por exemplo) participa de uma série de eventos fisiológicos, entre eles, a ativação de vias como a ciclooxigenase e lipoxigenase. Estas vias gerariam produtos (prostaglandinas, leucotrienos) que, em grandes quantidades, levariam a alterações celulares. Estresse, inflamações e infecções recorrentes, ao longo da vida, seriam responsáveis por produção de quantidades tóxicas de NO, levando a tais mudanças, intrínsecas do envelhecimento.

Após a primeira proposta de Harman (1956), muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de responder a questão: "as ERO/ERN são a única causa do envelhecimento, a maior causa, ou apenas um contribuinte menor para o processo?"

1.2. Radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN)

Radical livre, por definição, é qualquer espécie capaz de existência independente e que possua pelo menos um elétron desemparelhado, ou seja, pelo menos um elétron isolado em um orbital atômico ou molecular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Esse tipo de elétron pode reagir com átomos isolados (hidrogênio, íons metálicos, etc.) ou com moléculas (açúcares, proteínas, lipídios, DNA, etc.) sendo, esta propriedade, biologicamente relevante (SLATER, 1984; HALLIWELL, 1987; SIES, 1993).

O surgimento de O_2 atmosférico impôs uma condição pró-oxidativa aos seres vivos, uma vez que, este átomo possui um alto potencial padrão de redução ($E_0' = + 0,82 \text{ V}$). Este fato fez com que os organismos se adaptassem, de forma a utilizar o O_2 como principal acceptor final de elétrons nas oxidações biológicas e, assim, aumentar o rendimento energético deste processo. Ao mesmo tempo, os organismos desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante contra o ataque pró-oxidativo do O_2 e de moléculas reativas dele derivadas, para assegurar a integridade e funcionalidade das estruturas celulares.

Normalmente, os seres aeróbios reduzem a maior parte do oxigênio absorvido a água, através das enzimas da cadeia respiratória e do retículo endoplasmático. Na mitocôndria, o sistema enzimático envolvido no transporte de elétrons, reduz o oxigênio diretamente a água, fornecendo 4 elétrons ao mesmo. Entretanto, cerca de 1 a 3% deste oxigênio é parcialmente reduzido, gerando elementos intermediários reativos, denominados de espécies reativas de oxigênio, ERO (BOVERIS *et al.*, 1972). Este vazamento de elétrons da cadeia respiratória (pois os mesmos não chegam até a citocromo oxidase, para a redução total do

oxigênio) se dá em dois níveis: do complexo I, envolvendo a NADH coenzima Q redutase (TURRENS & BOVERIS, 1980) e do complexo III, mais precisamente da coenzima Q na sua forma radicalar (TURRENS *et al.*, 1985).

As quatro etapas envolvidas neste processo e que dão origem aos intermediários mencionados estão indicados a seguir:

Espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) impropriamente chamadas de radicais livres durante muito tempo, além de serem produzidas pela cadeia transportadora de elétrons, podem ser produzidas também, durante a biotransformação de xenobióticos que utilizam o sistema do citocromo P450 (JUNQUEIRA *et al.*, 1986; VIDELA *et al.*, 1989; VIDELA *et al.*, 1990; BARROS *et al.*, 1991) após exposição à radiação UVA e UVB (GERSCHMAN *et al.*, 1954) no processo de fagocitose (BABIOR, 1999) durante o metabolismo de compostos da dieta (AMES, 1983) no processo de isquemia-reperfusão, envolvendo a participação da xantina oxidase (McCORD, 1987) e na oxidação de catecolaminas (THOMAS *et al.*, 1976) entre outros processos.

Como se observa na tabela 1A, a meia-vida das principais ERO/ERN é bastante diferente, indicando a existência de diferentes mecanismos de defesa antioxidante.

O radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) é produzido por uma série de sistemas biológicos endógenos, como por exemplo pela ação de certas enzimas citosólicas (xantina oxidase, triptofano dioxigenase e aldeído oxidase) e durante a autooxidação de pequenas moléculas, tais como tióis, flavinas, quinonas, catecolaminas e pterinas (CROSS & JONES, 1991). Apesar de apresentar baixa

reatividade, esta espécie reativa de oxigênio, é capaz de inativar enzimas, como a catalase e glutathione peroxidase (FRIDOVICH, 1986). Por outro lado, através de sua ação indireta, pode causar danos a macromoléculas, como a peroxidação de lipídios, resultando na destruição de membranas e células (FRIDOVICH, 1978) ou a quebra de fita de DNA (MENEHINI, 1988).

Tabela 1A. Estimativa da meia-vida das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (SIES, 1993)

<i>Espécies Reativas de Oxigênio</i>	<i>Meia-Vida (s)</i>
HO•, radical hidroxila	10 ⁻⁹
RO•, radical alcóxila	10 ⁻⁶
ROO•, radical peróxila	7
H ₂ O ₂ , peróxido de hidrogênio	-(enzimático)
O ₂ ^{•-} , radical ânion superóxido	-(enzimático)
¹ O ₂ , oxigênio singlet	10 ⁻⁵
Q•-, radical semiquinona	Dias
NO•, radical óxido nítrico	1-10
ONOO ⁻ , peroxinitrito	0,05-1

Isto se deve ao fato do radical ânion superóxido ser um precursor de espécies oxidantes mais potentes, cuja produção depende da presença simultânea de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) através da reação de Haber-Weiss:

Esta reação ocorre em duas etapas e é catalisada por íons Fe^{+3} . O radical superóxido participa da redução do ferro à sua forma ferrosa ($\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-} \longrightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$) que pode, por sua vez, reduzir o peróxido de hidrogênio (FRIDOVICH, 1978). É o que ocorre na chamada reação de Fenton:

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido no organismo, principalmente por dismutação, espontânea ou catalisada pelas superóxido dismutases (SOD) do $\text{O}_2^{\bullet-}$, de acordo com a seguinte reação:

Além da atividade das superóxido dismutases, atividades de outras enzimas, como a monoamina oxidase, a urato oxidase, a D-aminoácido oxidase, também dão origem a H_2O_2 (KEHRER, 1993). Outra contribuição importante para a produção de H_2O_2 no organismo é dada por fagócitos ativados, onde o H_2O_2 é produzido pela dismutação não-enzimática do $\text{O}_2^{\bullet-}$ produzido pela NADPH oxidase (RUSSO *et al.*, 1989; LUNEC, 1990).

O H_2O_2 não é um radical livre, mas sim uma espécie reativa de oxigênio, uma vez que não possui elétrons desemparelhados no orbital mais externo. Apesar de não ser uma espécie particularmente reativa, o H_2O_2 é capaz de inativar enzimas, principalmente, pela oxidação de grupos tióis essenciais. O seu maior potencial oxidante, entretanto, é exercido de forma indireta (FLOYD & LEWIS, 1983) através da geração de radical hidroxila pela reação de Fenton. O H_2O_2 , nessas condições, torna-se um bom oxidante: quando em concentração suficiente, sua toxicidade é aumentada de 10 a 100 vezes em presença de ferro, podendo, desta forma, destruir estruturas celulares (EATON, 1991).

O H_2O_2 atravessa membranas facilmente, atinge o interior de outras células e, até mesmo, o núcleo da célula no qual foi gerado, levando a formação de $\text{HO}^\bullet$. Este fato foi demonstrado, por exemplo, em experimentos onde quebras de fita simples no DNA foram observadas *in vivo*, como resultado de uma reação de Haber-Weiss ocorrida no interior do núcleo celular (MELLO-FILHO & MENECHINI, 1984).

O radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) é uma das espécies químicas mais reativas que se conhece, ele tem a capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de moléculas biológicas, modificando suas funções. O $\text{HO}^\bullet$ é produzido biologicamente através da reação de Fenton, ou ainda, pela exposição de células, à radiação ionizante, devido à radiólise da água no seu interior. A velocidade de reação deste radical é muito alta, combinando-se praticamente com qualquer molécula, *in vivo*, assim que gerado, numa reação controlada pela velocidade de difusão do radical (GRISHAN, 1992).

Outra espécie reativa importante, o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) teve seu papel biológico identificado, como sendo o fator de relaxamento derivado do endotélio, no final da década de 80 (IGNARRO *et al.*, 1987). O $\text{NO}^\bullet$ é produzido a partir de L-arginina, NADPH e O_2 pela enzima NO sintase (NOS) da qual, pelo menos três isoformas já foram identificadas (McCANN & RETTORI, 1996; McDONALD & MURAD, 1996). Uma, constitutiva e citosólica, dependente de Ca^{+2} e calmodulina, libera $\text{NO}^\bullet$ por curtos períodos de tempo, em resposta a um receptor ou estímulo físico; essa isoenzima (eNOS) está presente no endotélio vascular e células epiteliais promovendo o relaxamento muscular (BREDT *et al.*, 1990). A outra forma da NOS é a neuronal (nNOS) que também é constitutiva e dependente de

Ca^{+2} , mas que está presente em células neuronais e do músculo esquelético (BREDT *et al.*, 1990). A terceira isoenzima é a NOS induzida (iNOS) após estímulo, geralmente inflamatório, em macrófagos, neutrófilos, hepatócitos, células musculares lisas e vários outros tipos celulares e, sintetiza $\text{NO}^\bullet$, por longos períodos de tempo. A iNOS requer tetrahydrobiopterina como cofator (MONCADA *et al.*, 1991; HEMMENS & MAYER, 1998).

O $\text{NO}^\bullet$, que apesar de ser um radical livre é uma espécie pouco reativa, tem uma química bastante complexa, exercendo efeitos diretos e indiretos sobre as moléculas biológicas. Os efeitos diretos, que predominam em baixas concentrações de $\text{NO}^\bullet$ ($< 1 \mu\text{M}$) incluem: 1) reações com complexos metálicos, tendo como resultado, entre outros efeitos, a inibição da catalase e dos citocromos c e P450, a ativação da guanilato ciclase e da hemeoxigenase e a oxidação da oxihemoglobina à metahemoglobina e 2) reações com espécies radicalares, tais como radicais alcóxila e peróxila, onde o $\text{NO}^\bullet$ pode ter um papel protetor, inibindo a peroxidação lipídica e a atividade da ciclooxigenase, que participa do metabolismo do ácido araquidônico. Os efeitos indiretos do $\text{NO}^\bullet$ envolvem a formação de espécies reativas de nitrogênio e tornam-se significantes em concentrações mais altas de $\text{NO}^\bullet$ ($> 1 \mu\text{M}$). Para tanto, o $\text{NO}^\bullet$ reage primeiramente com O_2 ou $\text{O}_2^{\bullet-}$, formando dióxido (NO_2) e trióxido de nitrogênio (N_2O_3) no primeiro caso ou, peroxinitrito ($\text{ONNO}^\bullet$) no segundo. Os efeitos das ERN podem ser subdivididos em nitração (formação de nitrotirosina) oxidação (produzindo quebra de fita de DNA ou peroxidação lipídica) e nitrosilação (formação de nitrosamina e S-nitrosotiol) (WINK & MITCHELL, 1998).

A figura 1 mostra as possíveis vias metabólicas geradoras das espécies reativas do oxigênio (ERO).

Figura 1: Vias metabólicas das espécies reativas do oxigênio (ERO). ERO, como H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$ e $HO^{\cdot}$ são produzidas nas células por diferentes vias. O $O_2^{\cdot -}$ gerado pelo extravasamento de elétrons da cadeia respiratória, também é produzido pela NADPH oxidase, NADPH citocromo P450 redutase, hipoxantina/xantina oxidase, lipoxigenase e ciclooxigenase. A superóxido dismutase (SOD) converte $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 que é degradado à H_2O pela glutationa peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Tireodoxina (TRX) tem atividade redutora de H_2O_2 e recupera proteínas oxidadas. H_2O_2 reagindo com $O_2^{\cdot -}$ produz pela reação de Haber-Weiss o $HO^{\cdot}$. ERO também são produzidas pela ação radiação ionizante (KAMATA & HIRATA, 1999.)

1.3. Alvos moleculares das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

As ERO e as ERN são capazes de interferir em vários processos biológicos, onde o dano causado está relacionado ao tipo da espécie reativa e à macromolécula atacada. Os principais alvos moleculares das espécies reativas são lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares.

A peroxidação de lipídios é iniciada pelo ataque de qualquer espécie suficientemente reativa, capaz de abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) de uma molécula de ácido graxo. Os ácidos graxos polinsaturados são particularmente sensíveis a esse ataque, o que apresenta grande importância biológica, uma vez que a maior parte dos ácidos graxos, presentes em membranas de células animais e em lipoproteínas, são polinsaturados. A presença da ligação dupla na cadeia carbônica do ácido graxo enfraquece a ligação do átomo de hidrogênio ligado ao carbono adjacente, especialmente se houver dupla ligação de um ou de ambos os lados do $-\text{CH}_2-$. O $\text{HO}^\bullet$ pode iniciar, com muita facilidade, a cascata de peroxidação de lipídios (BLAKE *et al*, 1987; COMPORTI, 1985; FREEMAN & CRAPO, 1982).

Contrastando com o $\text{HO}^\bullet$, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ apresenta pouca reatividade para abstrair o hidrogênio da molécula de ácido graxo; ainda que sua reatividade fosse alta, o fato deste radical apresentar carga representa um impedimento para entrar em ambientes hidrofóbicos. A forma protonada do $\text{O}_2^{\bullet-}$, o radical peridroxila ($\text{HO}_2^\bullet$) é mais reativo e pode abstrair um hidrogênio de ácidos graxos isolados, como os ácidos araquidônico, linoléico e linolênico. Entretanto, o $\text{HO}_2^\bullet$ parece preferencialmente estimular um processo de peroxidação lipídica já iniciado, através da reação com hidroperóxidos de lipídio (ROOH) (AIKENS & DIX, 1991).

O radical de carbono formado após a abstração do próton é estabilizado, formando um dieno conjugado. A seguir, este composto reage com oxigênio, produzindo o radical peroxila ($\text{ROO}^\bullet$) de acordo com a seguinte reação:

O radical peroxila pode então reagir com uma nova molécula de ácido graxo polinsaturado formando novo radical centrado no carbono, que, por sua vez, reage com oxigênio, dando origem a novos radicais peroxila, propagando desta forma a peroxidação de lipídios.

O radical peroxila, ao abstrair o hidrogênio de uma nova molécula de ácido graxo polinsaturado, se transforma em um peróxido de lipídio (ROOH). O termo peróxido de lipídio se refere também a peróxidos cíclicos, produtos intermediários da lipoperoxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A figura 2 mostra, resumidamente, as principais etapas da peroxidação de lipídios. Os efeitos gerais, decorrentes da peroxidação de lipídios são: diminuição da fluidez de membranas, facilidade na troca de fosfolipídios entre as duas monocamadas da membrana, aumento da permeabilidade da bicamada da membrana à substâncias que habitualmente não atravessam a mesma, a não ser através de canais específicos e, inativação de sistemas enzimáticos ligados à membrana (RICHTER, 1987).

A decomposição dos peróxidos de lipídios indica a terminação da peroxidação lipídica. Alguns peróxidos se decompõem na presença de metais de transição, como por exemplo, o ferro, produzindo pentano. Os gases etano e etileno são produzidos em reações similares, a partir de ácido linoléico. Ainda como produtos finais da peroxidação de lipídios podemos citar i) o malonildialdeído (MDA) que em pH fisiológico reage rapidamente com proteínas e ii) o 4-hidroxi-2-trans-nonenal (4-HNE) formado durante a peroxidação de ácidos graxos, como o ácido linoléico e araquidônico. Entretanto, considera-se que a

terminação efetiva da peroxidação lipídica envolve reações entre duas espécies reativas, com a formação de espécies de menor reatividade (PORTER, 1984).

A geração de radicais peroxila e alcoxila, aldeídos e outros produtos da peroxidação lipídica, em sistemas de membranas e em partículas de lipoproteínas, pode causar dano severo às proteínas aí presentes (RICHTER, 1987) (REFSGAARD *et.al.*, 2000). Está bem demonstrado que receptores de superfície celular, que permitem às células responder aos hormônios e citocinas, podem ser inativados durante a peroxidação de lipídios, da mesma maneira que o são enzimas como a Ca^{2+} -ATPase do retículo endoplasmático e a Na^+, K^+ -ATPase, envolvidas na manutenção do balanço iônico das células.

A exposição de proteínas à ação de ERO ou ERN pode levar à oxidação de resíduos de aminoácidos, à formação de ligações cruzadas entre proteínas e à oxidação do núcleo estrutural, levando a fragmentação da proteína. A oxidação de uma proteína pode, desta forma, levar à perda de sua função (BERLLET & STADTMAN, 1997).

Os grupos tióis, presentes nos aminoácidos cisteína e metionina, são facilmente oxidáveis através do ataque de várias ERO/ERN e pela sua reação direta com metais de transição, podendo haver a formação de radicais tiila ($\text{RS}^\bullet$):

Figura 2: Esquema geral da peroxidação de lipídios (ESTEBAUER *et al.*, 1992).

A metionina é rapidamente oxidável por $\text{HO}^\bullet$, $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , HOCl , cloraminas e ONOO^- . Os resíduos de metionina são, em geral, essenciais para a atividade de proteínas. Os resíduos de triptofano em proteínas são sensíveis ao dano pelo radical hidroxila e alguns outros radicais de oxigênio, gerando radicais peroxila e, eventualmente, N-formilquinurenina e quinurenina, produtos fluorescentes, característicos do processo oxidativo desse aminoácido. O triptofano é um potente seqüestrador de oxigênio singlet e pode ser fragmentado em proteínas expostas à estas espécies. O triptofano pode, também, ser nitrado pelo $\text{NO}_2^\bullet$ e sofrer reação de adição com o peroxinitrito. A oxidação de resíduos de histidina em proteínas pode ser, particularmente importante, nas reações de ligação cruzada em proteínas, assim como marcadores protéicos para proteólise. A histidina tem alta velocidade de reação com oxigênio singlet, formando vários produtos de oxidação, que podem ser detectados em proteínas expostas ao $^1\text{O}_2$ (DEAN, 1997).

Os resíduos de tirosina em proteínas podem ser atacados por ERN, sofrendo nitração, por HOCl , levando à cloração e, por ERO. Os radicais $\text{HO}^\bullet$ podem hidroxilar a tirosina à dihidroxifenilalanina. Os resíduos de tirosina são importantes no sítio ativo de diversas enzimas, além de participarem do processo de transdução de sinal. A nitração, a cloração ou a ligação cruzada de resíduos de tirosina podem bloquear a fosforilação da tirosina, comprometendo assim processos dependentes da transdução de sinal, tais como proliferação, diferenciação e transformação celular (BERLETT *et al.*, 1998).

Além dos efeitos indiretos que as ERO e as ERN têm sobre o DNA, através de alterações nos processo de transdução de sinal, da ativação de endonucleases devido ao aumento da concentração de íons Ca^{2+} , ou da

inativação de proteínas de reparo através de dano oxidativo, a molécula de DNA também pode sofrer o ataque direto de ERO/ERN, em células submetidas a condições de estresse oxidativo. A exposição de células a radiação ionizante, a concentrações elevadas de oxigênio, a fumaça de cigarro, a ozona, a substâncias que sofrem ciclo redox como a adriamicina, a drogas que sofrem autooxidação como a dopamina, noradrenalina e adrenalina e, ao fator de necrose tumoral α (TNF α) são algumas condições onde se tem observado aumento na quebra da fita de DNA. As principais consequências do dano oxidativo às bases do DNA são o aparecimento de mutações, diretamente pela ação de ERO/ERN, ou durante as tentativas da células de replicar ou reparar o DNA danificado (AMES, 1989).

Além do efeito de quebra de fita, que se dá pela abstração de um átomo de hidrogênio, o ataque do DNA pelo HO $\cdot$ gera uma diversidade de produtos de adição, uma vez que este radical reage com açúcares e bases purínicas e pirimidínicas do DNA, formando adutos (ARUOMA *et al.*, 1991; SHI *et al.*, 1994; OLINSKI *et al.*, 1992; DIZDAROGLU, 1993). Por exemplo, o HO $\cdot$ pode se adicionar à guanina nas posições 4, 5 ou 8 do anel purínico. A adição ao C-8 produz um radical aduto de OH em C-8, que eventualmente pode produzir tanto 8-hidroxi-guanina como a 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina, usualmente abreviada como FAPyG. De maneira similar, o HO $\cdot$ pode se adicionar ao C-4, C-5 ou C-8 da adenina, ou reagir com as bases pirimidínicas, timina e citosina, gerando uma série de produtos (CADET *et al.*, 1999).

O açúcar desoxirribose também é fragmentado pelo radical HO $\cdot$. Todas as posições do açúcar são susceptíveis à abstração de hidrogênio realizada pelo HO $\cdot$, com a subsequente formação de radicais centrados no carbono. Na presença de oxigênio, há uma conversão rápida destes em radicais peroxila, que

sofrem uma série de reações, incluindo desproporcionamento, rearranjo, eliminação de água e fragmentação da ligação C-C, produzindo uma razoável variedade de produtos carbonila (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Enquanto o ataque do radical $\text{HO}^\bullet$ sobre o DNA é quase totalmente indiscriminado, o do $^1\text{O}_2$ é muito mais seletivo. Ele produz, com eficiência, quebra da fita do DNA e gera, principalmente, produtos derivados da guanina, incluindo 8-hidroxi guanina e FAPyG (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991).

Os radicais gerados durante a peroxidação de lipídios ($\text{RO}_2^\bullet$, $\text{RO}^\bullet$) também podem causar dano ao DNA. Entretanto, parecem não ser tão eficientes quanto o $\text{HO}^\bullet$, sendo seu alvo preferido, novamente, a guanina. As ERN podem também atacar as bases do DNA, produzindo derivados nitrados, nitrosados e desaminados como, por exemplo, a 8-nitroguanina (MARNETT, *et al.*, 1985).

O DNA pode também ser modificado pelo H_2O_2 . Entretanto, tanto esta espécie, assim como o $\text{O}_2^{\bullet-}$, não reagem diretamente com o DNA. O mecanismo proposto para explicar este fato é que, no núcleo, em região bem próxima ao DNA, o peróxido de hidrogênio é convertido em radical hidroxila, através da reação de Fenton, catalisada por metais de transição (LLOYD & PHILLIPS, 1999).

O DNA mitocondrial, assim como o DNA genômico pode ser atacado por ERO/ERN. O dano ao DNA mitocondrial tem sido sugerido como evento importante em algumas patologias e no envelhecimento. Uma boa prova disto é o encontro de muito mais bases lesadas no DNA mitocondrial, medida como 8-hidroxideoxiguanosina, em fígado de ratos e cérebros humanos, do que no DNA nuclear. Este aparente aumento no dano oxidativo ao DNA mitocondrial, comparado ao nuclear, pode ser devido à proximidade do DNA mitocondrial ao sítio de geração de ERO durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória,

somado ao fato do DNA mitocondrial não apresentar proteção pelas histonas (YAKES & VAN HOUTEN, 1997).

1.4. Defesa antioxidante

A nível fisiológico, a defesa contra o dano provocado por ERO/ERN é realizada através da utilização de reservas antioxidantes celulares. A função primária dos antioxidantes é reduzir a velocidade de iniciação e/ou de propagação dos processos radicalares, suprimindo a geração de espécies reativas ou, eliminando-as, diminuindo, ou até inibindo, o dano oxidativo a uma molécula alvo. Um antioxidante é, então, qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquelas de um substrato oxidável, atrasa, significativamente, ou ainda evita, a oxidação deste substrato (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1994).

O sistema de defesa antioxidante inclui: a) agentes que removem, cataliticamente, ERO/ERN como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase; b) proteínas que minimizam a biodisponibilidade de catalisadores de reações que produzem ERO/ERN, tais como os íons ferro e cobre (transferrina, ferritina, haptoglobinas, hemopexina, metalotioneína e a ceruloplasmina; c) proteínas que protegem biomoléculas contra dano (inclusive dano oxidativo) por outros mecanismos, como por exemplo as proteínas de choque térmico e, d) substâncias de baixo peso molecular que sequestram ERO e ERN como a glutathione, tocoferóis, carotenóides, ácido ascórbico e, possivelmente, a bilirrubina e o ácido úrico (AMES *et al.*, 1981; FREI *et al.*, 1990; STOCKER *et al.*, 1987; KOHEN *et al.*, 1988). Alguns destes antioxidantes vêm da dieta, especialmente o ácido ascórbico e o α -tocoferol, acreditando-se haver uma

relação estreita entre a nutrição e o processo de defesa antioxidante. (BLOCK ^a, 1992; BLOCK ^b, 1992; FREI & AMES, 1992; BENDICH & BUTTERWORTH, 1991).

A composição da defesa antioxidante difere de tecido para tecido e de tipo celular para tipo celular (até mesmo de célula para célula do mesmo tipo) em um dado tecido. Os fluidos extracelulares possuem mecanismos protetores diferentes daqueles do ambiente intracelular. A defesa antioxidante pode, freqüentemente, ser induzida pela exposição do organismo a ERO e ERN e a moléculas de sinalização celular, tais como as citocinas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

1.4.1. Antioxidantes enzimáticos

O equilíbrio entre a atividade das três principais enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) é de extrema importância para a manutenção do equilíbrio entre produção e a remoção dos intermediários reativos de oxigênio dos sistemas biológicos. A atividade de SOD, que consiste na dismutação do íon superóxido formando peróxido de hidrogênio deve ser complementada pela CAT e GPx, gerando água e oxigênio molecular, no caso da CAT, ou água e glutathione oxidada quando da atividade da GPx.

A superóxido dismutase pode ser encontrada em diferentes isoformas já identificadas: a que contém cobre e zinco (CuZnSOD) (McCORD & FRIDOVICH, 1986) a que contém manganês (MnSOD) e ainda uma terceira que possui ferro em sua composição (FeSOD) (WANDERS & DENIS, 1992). Estas isoformas apresentam-se diferentemente distribuídas, conforme o comportamento celular e o organismo em questão. Em geral, as isoformas predominantes em procariotos

são MnSOD e FeSOD encontradas no citoplasma, enquanto que em eucariotos encontram-se a MnSOD, na matriz mitocondrial e uma CuZnSOD citoplasmática (ASADA *et al.*, 1980; DeJESUS *et al.*, 1989). As três formas catalisam, nominalmente, a mesma reação:

A glutathiona peroxidase é encontrada em vários tecido animais, mas não é comumente encontrada em vegetais e bactérias, existindo em duas formas: uma contendo selênio, isolada de eritrócitos (FLOHE, 1979) e outra que não contém selênio, isolada do fígado (LAWRENCE & BURK, 1976; BURK *et al.*, 1978). Algumas algas e fungos também apresentam esta enzima (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A GPx catalisa a redução do H_2O_2 , com oxidação conjunta da glutathiona reduzida (FLOHE & GUNZLER, 1974; CHANCE *et al.*, 1978) segundo a reação:

Além de H_2O_2 , a GPx selênio-dependente pode utilizar hidroperóxidos orgânicos, como substrato (FLOHE, 1979).

A GSSG produzida pela atividade da glutathiona peroxidase é, economicamente, recuperada pelas células na sua forma reduzida, através da atividade da glutathiona redutase, que utiliza como doador de poder redutor o NADPH produzido na via da pentoses-fosfato (FLOHE & GUNZLER, 1974; CHANCE *et al.*, 1978) de acordo com a reação a seguir:

A catalase faz parte do grupo das hemoproteínas e, em animais, encontra-se principalmente no fígado e eritrócitos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Catalisa uma reação de duas etapas, esquematizada a seguir:

A catalase decompõe o peróxido de hidrogênio em água e dióxigênio (FARBER *et al.*, 1990). Com exceção de algumas bactérias, algas verdes e azuis, e alguns parasitas helmintos, a maioria das células aeróbicas possuem atividade catalásica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A maioria das catalases purificadas são tetraméricas, sendo que cada um dos monômeros possui um grupo heme (Fe^{3+} -protoporfirina) ligado ao seu sítio ativo. Geralmente, encontra-se, ligada a cada subunidade, uma molécula de NADPH, que auxilia a estabilização da enzima (BEUTLER, 1975).

A atividade catalásica, nos tecidos animais e vegetais, encontra-se, predominantemente, em organelas subcelulares, circundadas por uma membrana simples, conhecida como peroxissomas. Entretanto, alguma atividade catalásica não peroxissomal pode ocorrer no fígado de alguns poucos animais, tais como o cobaio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

1.4.2. Antioxidantes não-enzimáticos

1.4.2.1. Compostos hidrossolúveis de baixo peso molecular

A – Glutathione (GSH)

Além de seu papel como cofator da glutathione peroxidase, a GSH está envolvida em muitos outros processos metabólicos, incluindo o metabolismo de ácido ascórbico, manutenção da comunicação entre células e impedindo a oxidação e ligação cruzada de grupos –SH protéicos. A GSH pode quelar íons cobre e diminuir sua capacidade de gerar ERO ou, pelo menos, de liberá-los em solução. A GSH é também um agente radioprotetor (GUZMAN-BARRON, 1951) e é um cofator para várias enzimas em diferentes vias metabólicas, incluindo as glioxilases e enzimas envolvidas na síntese de leucotrienos (KNOX, 1960; KOZARICH & CHARI, 1982; NUGTEREN & HAZELHOF, 1973; COTTEE *et al.*, 1977; DUCHESNE *et al.*, 1978).

In vitro, a GSH pode reagir com HO•, HOCl, peroxinitrito, RO•, RO₂•, radicais centrados no carbono e ¹O₂. Sua reação com espécies reativas gera radicais glutathionil (GS•) os quais, por sua vez, podem gerar O₂•⁻ através da reação:

Os radicais glutathionil podem, também, reagir com ácido ascórbico recuperando a GSH no seu estado reduzido (WARDMAN & VON SONNTAG, 1995).

A reação de GSH com peroxinitrito (ONOO⁻) parece levar à formação de um nitrosotiol (GSNO) que pode se decompor para regenerar óxido nítrico; desta

O ácido ascórbico puro é um sólido cristalino branco, muito solúvel em água. O ácido ascórbico possui dois grupos -OH ionizáveis (figura 3). Como o pK_{a1} é de 4,25 e o pK_{a2} é de 11,8, em pH fisiológico a forma monoiônica é favorecida. As plantas e a maioria dos animais pode sintetizar ácido ascórbico a partir de glicose (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1994). Os seres humanos, outros primatas, cobaias e morcegos frugívoros, entretanto, perderam a enzima requerida para o passo final da síntese, necessitando assim de ascorbato na dieta (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1994).

O ascorbato é requerido, *in vivo*, como cofator de pelo menos oito enzimas, das quais as mais conhecidas são a prolina hidroxilase e a lisina hidroxilase, envolvidas na biossíntese do colágeno (JAFFÉ, 1984; LEVINE *et al.*, 1985; LEVINE, 1986). O ascorbato também é requerido pela enzima dopamina- β -hidroxilase, que converte dopamina em noradrenalina (LEVINE *et al.*, 1985; LEVINE, 1986).

Figura 3: Estrutura do ácido ascórbico, do radical ascorbil e do ácido dehidroascórbico

A propriedade química mais notável do ascorbato é sua capacidade de agir como um agente redutor. Exemplos importantes são i) sua capacidade de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , importante na captação de ferro pelo intestino e, ii) a observação que o ascorbato dietário inibe a ação carcinogênica de diversos nitroso-compostos administrados na alimentação de animais, pode ser, em parte, atribuída a sua capacidade de reduzi-los a formas inativas. O ascorbato é, de fato, requerido por certas enzimas hidroxilásicas para manter o ferro ou cobre em seu sítio ativo na forma reduzida, necessária para que ocorra a hidroxilação (PETERKOFISKY & UDENFRIEND, 1965; KIVIRIKKO & PROCKOP, 1967; MYLLYLA *et al.*, 1978). O potencial de redução do ascorbato o coloca próximo ao fim da lista de espécies oxidantes, isto é, ele tende a reduzir espécies mais reativas como $\text{HO}^\bullet$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ (HALLIWELL, 1990).

A doação de um elétron pelo ascorbato dá origem ao radical ascorbil que pode ser oxidado adicionalmente para gerar deidroascorbato (DHA) (figura 3). O radical ascorbil é, relativamente, não-reativo e parece não ser capaz de reduzir O_2 a $\text{O}_2^{\bullet-}$. A fraca reatividade do ascorbil é a essência de muitos dos efeitos antioxidantes do ascorbato: um radical reativo interage com ascorbato e uma espécie muito menos reativa (ascorbil) é formada. O radical ascorbil sofre uma reação de desproporcionamento, regenerando uma parte do ascorbato.

Dentre os processos de regeneração molecular dos quais participa o ácido ascórbico, talvez, o mais importante, seja a reciclagem do α -tocoferol conforme a reação abaixo:

Uma vez que o ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel, não podendo entrar no interior das membranas hidrofóbicas, esse mecanismo pressupõe que o radical α -tocoferoxil possa mover-se para perto da superfície da membrana, para sua redução pelo ácido ascórbico que se encontra fora da membrana (HALLIWELL, 1990).

1.4.2.2. Compostos lipossolúveis de baixo peso molecular

A – Tocoferóis

O termo vitamina E abrange a família dos tocoferóis e dos trocotrienóis. Eles são constituídos de um anel cromanol hidrofílico (função álcool) e de uma cadeia lateral fitil hidrofóbica (cadeia carbônica ramificada) (figura 4). Na natureza, oito substâncias possuem atividade de vitamina E: d- α , d- β , d- γ e d- δ tocoferóis e d- α , d- β , d- γ e d- δ tocotrienóis. A forma mais eficiente, como antioxidante, presente nas membranas biológicas, é a d- α -tocoferol (figura 5) muitas vezes chamada de RRR- α -tocoferol ou ainda vitamina E (URANO *et al.*, 1992). Os outros tocoferóis são menos importantes para o ser humano porque, apesar de atuarem como antioxidantes, eles são pobremente absorvidos pela mucosa intestinal e pouco retidos nos tecidos do organismo. As membranas lipídicas têm a propriedade de se organizar em diferentes tipos de fases, caracterizadas por níveis diferentes de organização, de fluidez e de difusão lateral. Na fase “gel sólida” ($L\beta$) há pouca mobilidade dos ácidos graxos, devido às numerosas interações hidrofóbicas entre eles. Enquanto que na fase “cristal líquida” ($L\alpha$) as interações cooperativas são menores, possibilitando uma maior mobilidade lipídica. A passagem de uma fase a outra, pode ser resultante de uma mudança de temperatura, da presença de certos grupamentos químicos, ou ainda da

introdução de um novo composto químico. A insaturação das cadeias de ácidos graxos favorece a fase $L\alpha$. Estudos, utilizando sondas paramagnéticas, mostraram que o α -tocoferol e o colesterol exercem um efeito “tampão” sobre as bicamadas de fosfolípidios saturados, aumentando a desordem da fase $L\beta$ e a ordem da fase $L\alpha$ (SRIVASTAVA *et al.*, 1989; LÉGER, 1992). A atividade do α -tocoferol depende de sua mobilidade intramembranar, sendo que sua velocidade de difusão lateral, através dos ácidos graxos na fase $L\alpha$, é 100 vezes maior do que na fase $L\beta$ (LÉGER, 1992).

Os tocoferóis inibem a peroxidação lipídica porque seqüestram radicais peroxila ($ROO^{\bullet}$) muito mais rapidamente do que este radical pode reagir com as cadeias laterais de ácidos graxos, ou com proteínas de membrana:

O α -tocoferol é um antioxidante bloqueador de reações em cadeia, ou seja, ele implementa a reação em cadeia da peroxidação lipídica transformando-se em um radical, sendo consumido durante o processo. Age como um antioxidante fenólico, doador de um átomo de hidrogênio a radicais lipídicos de peroxila, com a finalidade de impedir a propagação da reação de peroxidação. Assim, intercepta os radicais peroxila ($ROO^{\bullet}$) doa um átomo de hidrogênio, viabilizando a formação de hidroperóxido lipídico ($ROOH$) transformando-se em radical tocoferoxil. O radical tocoferoxil resultante é relativamente estável e, em circunstâncias normais, insuficientemente reativo para iniciar a peroxidação lipídica *per se*, um critério essencial para um bom antioxidante. Estima-se que sob condições normais, o α -tocoferol detoxifica 90% dos radicais peroxila antes que eles reajam com ácidos graxos. Vários agentes redutores, incluindo, GSH, ácido ascórbico e ubiquinona,

podem reagir com o radical tocoferoxil e regenerar o α -tocoferol (KAY *et al.*, 1986; LIEBLER & BURR, 1992; URANO *et al.*, 1992).

Figura 4: Estrutura dos tocoferóis e tocotrienóis

Figura 5: Isômeros da vitamina E

Em razão de sua natureza lipídica, a absorção do α -tocoferol é realizada de maneira semelhante aos lipídios, necessitando para tal, das lipases digestivas, produzidas pelo pâncreas e, dos sais biliares, originários do fígado. A absorção intestinal do α -tocoferol é pequena em relação à quantidade ingerida, variando

entre 5 a 30%, dependendo da natureza do alimento e da forma ingerida (esterificada ou livre) (THAKUR & SRIVASTAVA, 1996).

Após a absorção intestinal, o α -tocoferol integra-se aos quilomicrons e, nesta forma, é liberado dentro da linfa e depois, para a circulação sangüínea. Os quilomicrons são partículas lipídicas grandes, ricas em triglicerídios, contendo também apoproteínas do tipo A e a apoB 48, que são sintetizadas pelos enterócitos. A incorporação do α -tocoferol nos quilomicrons, após sua absorção pelo trato gastrointestinal, é observada nas primeiras 6 horas e, os níveis basais retornam ao normal, após 12 horas da ingestão (BURTON, 1990).

O α -tocoferol é então integrado à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) a qual é sintetizada pelo fígado, a partir de lipídios dos quilomicrons e da apoB-100 (COGNY *et al.*, 1994). Tem sido confirmada a existência de uma proteína de transferência do RRR- α -tocoferol, a qual já foi purificada e clonada (ARITA *et al.*, 1995). Uma mutação em seu gene, causa uma deficiência familiar (carência idiopática) de vitamina E rara (TRABER *et al.*, 1990). A proteína de transporte do RRR- α -tocoferol regula a quantidade máxima de α -tocoferol plasmática a ser absorvida, dependendo da quantidade hepática da proteína. Desta maneira, a concentração máxima de α -tocoferol plasmática pode ser aumentada em no máximo, três vezes (TRABER, 1994).

O α -tocoferol permanece nas partículas lipídicas durante a remodelagem das VLDL em lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e, depois, em lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A proteína de transferência de lipídios plasmáticos (PLTP) facilita as mudanças do α -tocoferol para as diferentes classes de lipoproteínas (KOSTNER *et al.*, 1995). O α -tocoferol encontra-se principalmente nas partículas de LDL e HDL (COGNY *et al.*, 1994).

A distribuição do α -tocoferol se dá obedecendo a seguinte ordem decrescente de concentração: fígado, músculo esquelético, tecido adiposo, pulmões e baço. No sangue, as hemácias e as plaquetas são as células mais ricas em α -tocoferol. Este, por sua vez, penetra nas células por intermédio das LDL e do receptor apoB/E. A transferência para as células pode ser feita também a partir dos quilomicrons e das VLDL, após a ação da lipoproteína lipase (TRABER *et al.*, 1985).

Existem poucos estudos referentes à localização subcelular da α -tocoferol, entretanto, devido ao seu caráter lipofílico, sua localização é, preferencialmente, no ambiente fosfolipídico das membranas. SAKAMOTO *et al.* (1990) demonstraram que em macrófagos de ratos, ela se encontra, em sua totalidade, na membrana. Por outro lado, foi demonstrado que nas células do músculo liso vascular, o α -tocoferol está associado a uma proteína citosólica, unicamente na fase G1 do ciclo celular (NALECZ *et al.*, 1992).

B – Ubiquinona

Coenzima Q, também conhecida como ubiquinona, foi caracterizada por Frederick Crane em 1957. A estrutura da coenzima Q consiste de um anel quinona ligado a uma cadeia lateral isoprenóide. O número de unidades de isopreno na cadeia lateral varia, para cada espécie animal, ou planta. A coenzima Q humana apresenta 10 unidades de isopreno e é designada CoQ₁₀.

Um dos compostos, presente em membranas, que pode atuar como um antioxidante bloqueador de reações em cadeia e recuperar o radical tocoferoxil, é a ubiquinona, ou coenzima Q₁₀, em sua forma reduzida (FREI & AMES, 1990; STOCKER *et al.*, 1991; SUARNA *et al.*, 1993). O papel mais importante da

coenzima Q₁₀ é no transporte de elétrons mitocondrial para a produção de energia. A ubiquinona é encontrada na membrana plasmática, em todas as membranas intracelulares (especialmente no complexo de Golgi e lisossomos) e nas lipoproteínas de baixa densidade (KAGAN *et al.*, 1994).

FREI *et al.*, descreveram a ubiquinona como exercendo uma atividade seqüestradora de radicais e inibindo a peroxidação lipídica em lipossomas, membranas (células, mitocôndrias, partículas submitocondriais, microssomas) e em lipoproteínas. Sugeriram também, que a ação antioxidante direta pode ser uma importante função fisiológica da coenzima Q₁₀. Entretanto, ressaltaram a necessidade de altas concentrações para que ela exiba atividade antioxidante (FREI *et al.*, 1990).

O mecanismo de ação molecular responsável pela sua atividade antioxidante é ainda discutido. Apesar de sabermos várias de suas propriedades, não se sabe se o ubiquinol, presente no células e fluídos do organismo humano, seqüestra os radicais peroxila,

ou, se ele atua regenerando o α -tocoferol,

ou, se participa de ambos processos (KAGAN *et al.*, 1994).

C – Carotenóides

Os carotenóides não são oficialmente reconhecidos como nutrientes essenciais. Alguns carotenóides têm atividade pró-vitamina A, que é um nutriente essencial. Entretanto, contínuo e crescente número de evidências mostram que os efeitos benéficos dos carotenóides são independentes da atividade pró-

vitamina A. Carotenóides são antioxidantes que protegem a integridade celular e diminuem o risco de desenvolvimento de doenças degenerativas, aumentam a ação do sistema imunológico, são eficazes no tratamento da protoporfiria eritropoiética e ativam a expressão de genes envolvidos na comunicação célula-célula (KRINSKY, 1993).

Os carotenóides são moléculas de cadeia longa, com 40 átomos de carbono e um extenso sistema conjugado de duplas ligações. Possuem múltiplas configurações geométricas devido a possibilidade de rotação em torno dessas duplas ligações; essas características estruturais podem interferir na sua atividade antioxidante *in vivo*. Dentre os que possuem efetiva ação antioxidante podemos citar o licopeno e o β -caroteno, este último com atividade de pró-vitamina A (STAHL & SIES, 1996) (figura 6).

Figura 6: Estrutura de alguns carotenóides

Essas substâncias têm a capacidade de captar a energia de moléculas que se encontram em alto estado energético, absorvendo-a e diminuindo, ou até

anulando, tal estado de excitação. Essas transições entre os estados de energia estão associadas com alterações na configuração de elétrons na molécula, o que pode influenciar a reatividade dessas substâncias com outras espécies. Sabe-se, por exemplo, que o β -caroteno é um potente neutralizador do oxigênio singlet, atuando através desse mecanismo de transferência de energia, onde a molécula de oxigênio singlet é convertida à uma molécula menos reativa, oxigênio triplet, ao mesmo tempo que a molécula de β -caroteno é promovida ao seu estado triplet (MACHLIN & BENDICH, 1987). Subseqüentemente, a molécula excitada de β -caroteno libera sua energia na forma de calor. Nesta reação o β -caroteno age cataliticamente, sem ser consumido na reação.

Os carotenóides também podem atuar como varredores de $\text{ROO}^\bullet$ e outras formas de oxigênio ativo, características do estresse oxidativo em sistemas animais, $\text{HO}^\bullet$ e ácido hipocloroso. O mecanismo exato pelo qual os carotenóides inibem a peroxidação lipídica ainda não está completamente elucidado. BURTON e INGOLD propuseram, em 1984, que a inibição da peroxidação lipídica pelo β -caroteno ocorre devido a formação de um complexo transitório de radical livre com o radical peroxila (BURTON & INGOLD, 1984).

O licopeno é um carotenóide que não possui atividade pró-vitamina A. Da mesma forma que o β -caroteno, possui atividade antioxidante, protegendo a integridade celular e diminuindo o risco de desenvolvimento de doenças degenerativas (STAHL & SIES, 1996).

1.4.3. Cooperação *in vivo* do sistema de defesa antioxidante

A catalase e o sistema glutathiona peroxidase trabalham para metabolizar peróxidos intra- e extracelularmente, como é a decisão celular e/ou tecidual de

qual deles deve participar da detoxicação? Podemos imaginar, então, que os sistemas mencionados funcionam de forma cooperativa nos tecidos animais. Esta questão é fácil de se responder quando quantidades distintas dos sistemas estão presentes em alguns tecidos animais: o músculo esquelético, os espermatozóides e algumas regiões do cérebro, por exemplo, contém pouca catalase e muita glutathione peroxidase, sendo esta última mais importante, neste caso, na remoção de peróxidos *in vivo*. Entretanto, a maior parte dos tecidos animais têm quantidades equivalentes de GPx e catalase; neste caso como funciona o sistema cooperativo? Vejamos alguns exemplos. Os eritrócitos de mamíferos não possuem organelas e, tanto a catalase quanto a GPx, estão dispersas no citoplasma, apesar de algumas moléculas da catalase poderem se ligar à face interna da membrana do eritrócito. A velocidade, normalmente baixa, de produção de H_2O_2 nestas células parece ser um problema da GPx. Por outro lado, quando a concentração de H_2O_2 sobe, então o papel desempenhado pela catalase assume importância na remoção do peróxido. Isto faz sentido, uma vez que a catalase tem alto K_m para H_2O_2 , trabalhando em velocidade alta, quando os níveis de H_2O_2 são altos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A evidência de que GSH e ascorbato interagem *in vivo* é fornecida por experimentos, onde animais tratados com inibidores da síntese de GSH, mostraram uma depleção severa de glutathione, levando ratos recém-nascidos e cobaias à morte, a qual pode ser evitada por altas doses de ascorbato (mas não DHA). O escorbuto, que aparece em cobaias alimentadas com uma dieta com baixas concentrações de ascorbato, é adiado pela administração de precursores da GSH. Em hepatócitos isolados de camundongos, a diminuição dos níveis de GSH aumenta a síntese de ascorbato (MEISTER & ANDERSON, 1983). Estas

últimas evidências podem, em parte, explicar resultados na literatura, mostrando um papel deletério do ácido ascórbico sobre a parede de vasos de grande calibre. É muito provável que, em altas concentrações, e, na ausência de quantidades apropriadas de GSH (ou de seus precursores) o ácido ascórbico se comporte com um oxidante, lesando as macromoléculas do tecido em questão, ou ainda, alterando sua fisiologia. Isto se deve às suas propriedades oxidantes, tão importantes quanto às redutoras (BODE, 1997). Temos assim, forte indicação que os antioxidantes agem em conjunto, orquestradamente, ou seja, o aumento no organismo de apenas um deles, pode fazê-lo executar funções, terapêutica ou preventivas, oxidantes e não antioxidantes, como o pretendido.

O radical tocoferoxil resultante da oxidação do tocoferol, pode ser regenerado por vários agentes redutores, incluindo, GSH, ácido ascórbico e ubiquinona (KAY *et al.*, 1986; FREI & AMES, 1990; URANO *et al.*, 1992). Entretanto, se a concentração de radicais derivados dos ácidos graxos (tipo peroxila) for muito alta, a regeneração dos radicais tocoferoxil pode não se equiparar ao dano oxidativo sofrido pelo α TC e, sob estas condições, o radical de vitamina E é irreversivelmente destruído (NIKI, 1996).

Uma vez que o ácido ascórbico é hidrossolúvel, que não pode entrar no interior das membranas hidrofóbicas, esse mecanismo pressupõe que o radical tocoferoxil possa mover-se para perto da superfície da membrana, para sua redução pelo ácido ascórbico que está fora da membrana (HALLIWELL, 1990).

É importante considerar cada antioxidante como um componente de um sistema com complexas interdependências e interações. A ação dos antioxidantes no organismo humano é dinâmica e pode ser afetada por uma série de fatores,

incluindo dieta, meio-ambiente, estado fisiológico, exercícios, doenças e outros (PAPAS, 1999).

1.5. *BURST* oxidativo de neutrófilos humanos

1.5.1. Neutrófilos e ativação da NADPH oxidase

Os neutrófilos são os leucócitos polimorfonucleares mais abundantes na circulação sangüínea e desempenham um papel essencial na resposta inflamatória e na defesa contra microorganismos invasores. Durante a resposta inflamatória, estas células são rapidamente mobilizadas para o local da lesão, onde elas fagocitam agentes patogênicos e/ou fragmentos de tecidos danificados, liberando, subsequente, espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN) assim como, enzimas proteolíticas e proteínas catiônicas. Estes compostos irão por sua vez, destruir e digerir o microorganismo fagocitado. Entretanto, pode ocorrer extravasamento destes produtos tóxicos para o meio extracelular, o que resultará em lesão dos tecidos circundantes (BABIOR, 1978; KLEBANOFF, 1980). Estas lesões teciduais, causadas por ERO/ERN estão associadas a uma variedade de doenças inflamatórias, dentre elas, artrite reumatóide (KITSIS & WEISSMANN, 1991) lesão por isquemia e reperfusão (ZIMMERMAN & GRANGER, 1994) e síndrome do distresse respiratório do adulto (BOXER *et al.*, 1990).

A resposta dos neutrófilos aos agentes lesivos inicia-se pela sua ativação por diversos estímulos, que podem agir através da ligação a receptores de membrana da célula, como bactérias opsonizadas e o peptídeo sintético N-formil-metionil-fenilalanina (fMLP) ou, então, pela ativação direta de proteínas quinases

intracelulares, como ésteres de forbol, que são agentes carcinogênicos e que tem a propriedade de ativar a proteína quinase C (BABIOR, 1988).

A produção do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pelos neutrófilos requer o desencadeamento de uma seqüência de eventos metabólicos denominados de *burst* oxidativo. Estes eventos envolvem o aumento do consumo de oxigênio, de glicose e de agentes redutores, como o nucleotídeo nicotinamida adenosina fosfato reduzida (NADPH) e também, a ativação de um complexo enzimático na membrana celular, denominado de NADPH oxidase (BABIOR, 1978).

A NADPH oxidase leucocitária catalisa a produção de $O_2^{\bullet-}$ através da redução unieletrônica do oxigênio molecular, utilizando NADPH como doador de elétrons (BABIOR, 1999):

Por sua vez, o $O_2^{\bullet-}$ é convertido rapidamente a outras espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$) e o ácido hipocloroso (HClO) os quais, juntamente com as proteínas liberadas dos grânulos citoplasmáticos, são os principais responsáveis pela ação microbicida e lesiva dos neutrófilos (ROSEN *et al.*, 1995).

Nos neutrófilos, $HO^{\bullet}$ também pode ser produzido pela reação do ácido hipocloroso (HOCl) com $O_2^{\bullet-}$ (RAMOS *et al.*, 1992):

Por ser bastante reativo, $HO^{\bullet}$ possui uma ação microbicida limitada; mesmo dentro do fagossomo este radical, provavelmente, reage com outros alvos antes de atingir o microorganismo (WOLCOTT *et al.*, 1994).

O oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$) pode ser produzido nos neutrófilos pela reação do H_2O_2 com o HOCl. STEINBERG *et al.*, (1992) mostraram que a produção de oxigênio singlet por estas células é superior a 19%. Contudo, a importância deste composto como agente bactericida em neutrófilos, não está bem estabelecida. Adicionalmente, outra fonte de ERN nos neutrófilos, é através da oxidação de nitritos, tanto pela mieloperoxidase (MPO) como pelo HOCl (VAN DER ULJET *et al.*, 1997).

A maior parte do H_2O_2 produzido pelos neutrófilos, é convertido a HOCl, pela ação da enzima mieloperoxidase (MPO) contida nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (KETTLE & WINTERBOURN, 1997). O HOCl, por sua vez, é o principal e o mais potente oxidante microbicida produzido pelos neutrófilos (KLEBANOFF, 1968). Cloraminas podem ser geradas pela reação do HOCl com aminas, as quais, também, possuem uma ação microbicida (THOMAS & LEARN, 1991; GRISHAM *et al.*, 1984). A MPO pode gerar peróxidos e derivados fenólicos hidroxilados como salicilatos (KETTLE & WINTERBOURN, 1994; WINTERBOURN *et al.*, 1997).

O complexo enzimático NADPH oxidase é constituído por componentes que se encontram dissociados na célula em repouso. Estes são a p40^{phox} , a p47^{phox} e a p67^{phox} , agrupados num complexo proteico citoplasmático de 240 kDa. Temos, também, o citocromo b_{558} , composto pelas proteínas p22^{phox} e $\text{gp91}^{\text{phox}}$, localizadas nas membranas das vesículas secretórias e dos grânulos específicos citoplasmáticos. Participam também do complexo enzimático, duas proteínas de baixo peso molecular ligantes de nucleotídeo guanosina: a Rac 2, que encontra-se no citoplasma, formando um complexo dimérico com Rho-GDI (inibidor de

dissociação do nucleotídeo guanosina) e a Rap 1A, presente no citoesqueleto (BABIOR, 1999; DeLEO & QUINN, 1996).

No neutrófilo ativado, o componente citosólico $p47^{\text{phox}}$ é fosforilado, resultando na migração de todo o complexo para a membrana plasmática. Uma vez na membrana, o complexo associa-se ao citocromo b_{558} , que migrou para a mesma através da fusão das vesículas secretórias e dos grânulos específicos. Durante a ativação, a Rac 2 liga-se ao trifosfato de guanosina (GTP) e migra para a membrana juntamente com o complexo citosólico (BABIOR, 1999; DeLEO & QUINN, 1996). O acoplamento de todos os componentes à membrana formará, assim, o complexo cataliticamente ativo (figura7).

Figura 7: Acoplamento dos componentes da NADPH oxidase após ativação dos neutrófilos. (BABIOR, 1999).

1.5.2. Mecanismos de sinalização envolvidos na ativação da NADPH oxidase

A cascata de sinalização intracelular compreende um sistema complexo de amplificação, que inicia-se a partir de um sinal extracelular na membrana

plasmática, terminando por acionar uma resposta celular, como proliferação, diferenciação, síntese de proteínas ou ativação. A partir da estimulação da membrana, seguida da quebra de lipídios constituintes desta, haverá a liberação de segundos mensageiros que, por sua vez, irão ativar uma cascata de interações entre proteínas. Estas interações são, geralmente, resultantes de modificações covalentes, ocasionadas por reações de fosforilação em resíduos de tirosina e/ou de serina/treonina (HUG & SARRE, 1993).

Têm sido demonstrado haver um aumento de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina, durante a ativação de neutrófilos, resultando em produção de ERO/ERN (BERKOW *et al.*, 1989; GOMES-CAMBRONERO, 1989; BERKOW & DODSON, 1990; ROLLET *et al.*, 1994). Por exemplo, as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases) são fosforiladas em tirosina, após a ativação de neutrófilos por diversos agonistas que induzem a produção de ERO/ERN (FIALKOW *et al.*, 1994). As MAP quinases são serina/treonina quinases, que nos neutrófilos, uma vez ativadas, irão fosforilar os componentes da NADPH oxidase, p47^{phox} e p67^{phox} (EL BENNA *et al.*, 1996; EL BENNA *et al.*, 1997).

O estado de fosforilação, em resíduos de serina, treonina ou de tirosina, das proteínas envolvidas na cascata de ativação do *burst* oxidativo dos neutrófilos, é determinado pelo balanço entre as atividades das proteínas quinases e das proteínas fosfatases intracelulares.

1.5.2.1. Ativação da cascata de sinalização através da ligação ao receptor, mediada por proteínas G

A maioria das funções dos neutrófilos mediadas por receptores são desencadeadas por proteínas ligantes de GTP (proteínas G) as quais providenciam uma conexão entre os receptores de membrana ocupados e a ativação de enzimas intracelulares, como fosfolipases e quinases. Existem dois grupos de proteínas G: as heterotriméricas e as de baixo peso molecular. Ambas desempenham papéis importantes na modulação de várias funções dos neutrófilos.

As proteínas G heterotriméricas regulam a atividade da adenilato ciclase, sendo as que ativam a enzima, denominadas de G_s e, as que inibem, de G_i . A adenilato ciclase ativada pelas proteínas G, irá agir sobre o seu substrato, resultando em produção de AMP cíclico. Além da regulação da adenilato ciclase, estas proteínas G regulam a atividade de muitas fosfolipases. Nos neutrófilos, a ativação da fosfolipase C, desencadeada pela proteína G, irá resultar na clivagem de fosfolipídios de membrana, gerando os segundos mensageiros, diaciglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3) (McPHAIL *et al.*, 1991). Este último irá promover o aumento de cálcio citosólico, através da liberação do íon de seus estoques intracelulares. O cálcio, por sua vez, tem seu papel no deslocamento da proteína quinase C (PKC) para a membrana celular, necessária para a ativação desta enzima (BAGGIOLINI & THELEN, 1991). O outro segundo mensageiro, o DAG, ativa a PKC, ligando-se ao seu domínio regulatório e promovendo o seu desligamento do pseudosubstrato inibitório (NISHIZUKA, 1988). A PKC, ativa diversas proteínas citosólicas, fosforilando estas em seus resíduos de serina e treonina (HUG & SARRE, 1993). Dentre as proteínas fosforiladas pela PKC temos

a p47^{phox} e a p67^{phox}, componentes citosólicos da NADPH oxidase, os quais uma vez fosforilados, irão se deslocar e se acoplar aos componentes de membrana da NADPH oxidase (CLARK, 1990; LABADIA & HUANG, 1996; EL BENNA *et al.*, 1996; EL BENNA *et al.*, 1997). As MAP quinases também podem ser fosforiladas pela PKC em seu resíduos de serina/treonina (THOMAS *et al.*, 1992; ZU *et al.*, 1996). (figura 8).

Além das proteínas G heterotriméricas de alto peso molecular, uma superfamília de proteínas ligantes de GTP de baixo peso molecular, estruturalmente relacionadas com *ras*, desempenham papel fundamental no crescimento e diferenciação celulares. Um número crescente de evidências experimentais sugere que essas proteínas G de baixo peso molecular participam da degranulação e fusão de fagolisossomas e da movimentação de grânulos, em neutrófilos (EDWARDS, 1994).

Figura 8 : Cascata de sinalização da ativação da NADPH oxidase, mediada por proteína G. A ligação do receptor de membrana a um estímulo extracelular, irá ativar a proteína G, resultando na clivagem de lipídios pela fosfolipase C, dando origem aos segundos mensageiros, IP₃ e DAG. O IP₃ irá promover o aumento de Ca²⁺ citosólico, responsável pela mobilização da proteína quinase C (PKC). O DAG irá ativar a PKC e, esta, irá fosforilar os componentes da NADPH oxidase, p47^{phox} e p67^{phox} e, também, MAP quinases.

1.5.2.2. Efeitos do α -tocoferol em PMN e macrófagos

Estudos de BAEHNER *et al.* (1977) mostraram os efeitos da suplementação oral de α -tocoferol em humanos sobre as funções de PMN. Eles observaram que nos indivíduos suplementados, os PMN apresentaram um atividade fagocítica aumentada e, uma atividade microbicida diminuída em relação aos indivíduos controle.

CHAN *et al.* (1998) estudaram a atividade de PMN humanos, isolados de indivíduos saudáveis com idades entre 20 e 80 anos e de indivíduos (60-63 anos)

portadores de doenças coronarianas (DC). Eles mostraram um aumento do *burst* oxidativo dos neutrófilos em função da idade. O *burst* oxidativo de PMN dos idosos DC era, ainda maior, que aquele de neutrófilos isolado do grupo de indivíduos saudáveis de mesma idade. A atividade fagocítica não se encontrou alterada em função da idade; no entanto, a atividade fungicida diminuiu (17%) nos idosos com idade igual ou superior a 70 anos. Ainda neste trabalho, foram demonstrados os efeitos de uma suplementação oral antioxidante (800 mg de α TC, 2g de vitC, 30 mg de β CT e 100 μ g de selênio) sobre as funções de PMN nos pacientes DC. Eles observaram que, nos indivíduos suplementados, os PMN apresentaram *burst* oxidativo diminuído e atividade fungicida aumentada, em relação ao grupo de idosos saudáveis de mesma idade, não suplementado.

Outros estudos mostraram, em fagócitos, uma produção de $O_2^{\bullet-}$ diminuída em indivíduos que receberam 1200 UI de α -tocoferol por dia, durante 8 semanas (DEVARAJ *et al.*, 1997). O efeito inibidor do α -tocoferol sobre a produção de $O_2^{\bullet-}$ também foi observada em macrófagos de ratos estimulados por PMA (SAKAMOTO *et al.*, 1990) mas não de macrófagos estimulados por concanavalina A (YANO & ICHIKAWA, 1993) nem de PMN humanos estimulados com zymosan opsonizado (OKANO *et al.*, 1991).

Adicionalmente, a incubação *in vitro* de neutrófilos peritoneais de ratos, estimulados por PMA, com concentrações crescentes de α -tocoferol, mostrou uma inibição dose-dependente da produção de $O_2^{\bullet-}$ por estas células (KANNO *et al.*, 1995).

Recentemente, foi demonstrado que a adesão de neutrófilos humanos, estimulados por fMLP ou LDL oxidada, às células endoteliais HUVECs, é diminuída pelo α -tocoferol (YOSHIDA *et al.*, 1999).

Em monócitos humanos, a atividade da PKC é fortemente inibida pela incubação *in vitro* com α -tocoferol (CACHIA *et al.*, 1998). O α -tocoferol administrada *in vivo*, também apresentou propriedades inibitórias sobre a atividade da PKC de macrófagos peritoneais de ratos, estimulados com PMA (acetato de forbol miristato) (SAKAMOTO *et al.*, 1990). Ambas as inibições, dos monócitos e dos macrófagos, são acompanhadas de uma diminuição da produção de superóxido por estas células.

Recentemente, CHAN *et al.* (2001) mostraram o efeito do α -tocoferol na modulação das vias de sinalização, dependentes e independentes de PKC, envolvidas na ativação da NADPH oxidase em PMN humano. Esta modulação é exercida pelo α -tocoferol, através da ativação de serina/treonina e tirosina fosfatases.

1.6. Estresse Oxidativo e Envelhecimento

Mudanças que possam ocorrer com a idade, aumentando as taxas de pró-oxidantes ou diminuindo os mecanismos de defesa antioxidante, podem ser a explicação para muitas das alterações orgânicas que ocorrem com o envelhecimento em processos degenerativos como a Doença de Parkinson, o mal de Alzheimer e outros (MECOCCI *et al.*, 1994; BUSCIGLIO *et al.*, 1995; MIRANDA *et al.*, 2000; SOUZA-PINTO *et al.*, 1999).

A interação das ERO/ERN com as bases do DNA pode promover câncer, mutações ou contribuir para o envelhecimento, podendo inclusive causar dano a sítios regulatórios de genes e levar à morte celular (AMES, 1993; MENEHINI, 1988; AMES & GOLD, 1991; CUTLER, 1991; ASHOK & ALI, 1998). Estima-se que o DNA humano sofra cerca de 10.000 ataques oxidativos por células por dia,

enquanto em ratos esta taxa se eleva para 100.000 por célula por dia (AMES *et al.*, 1993). Alterações produzidas em moléculas de DNA induzidas por irradiação UV através de radicais livres podem ser o fator causal de muitas doenças neoplásicas relacionadas à idade.

A integridade do DNA tem relação com o envelhecimento, apesar do dano nele encontrado não poder ser unicamente responsável por todas as mudanças que ocorrem no envelhecimento (ASHOK & ALI, 1999).

Há uma relação entre a peroxidação de lipídios e o processo do envelhecimento evidenciada pelo acúmulo, com a idade, de pigmentos fluorescentes, gerados pelo menos em parte pela ligação de proteínas a produtos de lipoperoxidação (BRUNK *et al.*, 1992). O aumento e depósitos progressivos de materiais fluorescentes com a idade ocorre na maior parte dos tecidos, particularmente aqueles constituídos de células pós-mitóticas. Este acúmulo de lipofucsina é detectada mais consistentemente em neurônios e células cardíacas, enquanto células regenerativas, como os hepatócitos, exibem apenas um pequeno acúmulo. Subseqüentemente, o acúmulo de lipofucsina passou a ser considerado um evento relacionado ao envelhecimento (PORTA, 1988; NAKANO *et al.*, 1994).

Como as proteínas são importantes componentes estruturais e funcionais das células, as mesmas também são alvos de modificações oxidativas por ERO/ERN. Como as proteínas oxidadas aparentemente não exercem qualquer função (STADMAN, 1990) e são produtos deletérios à manutenção da homeostase celular, a sua remoção é essencial. A degradação de proteínas alteradas por meio da digestão proteolítica é um processo extremamente eficiente, sendo uma de suas características mais notáveis o fato de que

proteínas oxidativamente alteradas tornam-se mais propensas à proteólise, portanto tornando-as substratos preferenciais para enzimas proteolíticas. Este sistema de reparo é considerado parte de um sistema geral e coordenado de defesa celular no qual, proteínas oxidativamente modificadas são capazes de ativar o sistema proteolítico (DAVIES *et al.*, 1990). Apesar da ação específica de enzimas que hidrolisam proteínas oxidadas estas, acumulam-se com a idade (OLIVER *et al.*, 1987; STADTMAN, 1992; KLAUNING *et al.*, 1998; STADTMAN & BERLETT, 1998). Avalia-se que o aumento na oxidação de proteínas seja de 100% entre as idades de 10 e 80 anos, quando estimado pelo conteúdo de carbonila. Em duas patologias humanas relacionadas com o envelhecimento precoce, a Síndrome de Werner e a progeria, o nível de proteína oxidada, determinado em cultura de fibroblastos isolados de pacientes portadores destas patologias, se encontra muito mais alto quando comparado a indivíduos normais e/ou idosos normais (STADTMAN, 1997) sugerindo uma inter-relação entre o processo de envelhecimento e o acúmulo de proteínas, oxidativamente modificadas.

Estas e outras observações das possíveis implicações dos danos oxidativos no processo de envelhecimento tem levado ao estudo dos mecanismos de defesa antioxidante.

Existe um sensível balanço entre oxidantes e antioxidantes na saúde e na doença. Este equilíbrio parece ser essencial para a manutenção de um saudável envelhecimento.

O termo estresse oxidativo indica que a relação entre o “*status*” antioxidante das células e tecidos e a geração e/ou atividade dos oxidantes está desbalanceada a favor do segundo. O estado redox de uma célula depende do

grau de oxidação de suas biomoléculas. Os antioxidantes moleculares encontrados no meio intracelular, em estado reduzido, ajudam a prevenir o dano oxidativo. Entre eles, podemos citar a glutathione, a tireodoxina, o α -tocoferol, a vitamina C e os carotenóides. As enzimas antioxidantes concorrem com sua atividade, também, para a manutenção da integridade das macromoléculas. Porém, mudanças no estado redox aumentam o “*status*” de estresse oxidativo, levando ao dano (SIES, 1993)

Hipóteses coerentes estão a favor da idéia que diminuindo-se o estresse oxidativo durante o envelhecimento, poderia haver um benefício clínico. Inúmeros trabalhos epidemiológicos sugerem o envolvimento de ERO/ERN no desenvolvimento de doenças. Adicionalmente, foi demonstrado que o aumento no *status* de antioxidantes se correlaciona com a redução de risco para diversas patologias. Mais e mais evidências associam o balanço entre oxidantes e antioxidantes na manutenção da saúde e longevidade (PACKER & CADENAS, 1999).

Os mecanismos envolvidos no acentuado efeito da restrição alimentar sobre o câncer e envelhecimento estão sendo esclarecidos e devem-se à redução do dano oxidativo às células (SIMIC & BERGTOLD, 1991; SZATROWSKI & NATHAN, 1991). A teoria de que as funções de manutenção do organismo encontram-se acentuadas em ratos sujeitos à restrição calórica, resultando portanto num menor dano oxidativo, são apoiadas por relatos de um reparo de DNA mais eficiente, uma respiração mitocondrial melhor acoplada e no retardo do declínio idade-dependente de algumas defesas antioxidantes (KOIZUMI *et al.*, 1987; ROE *et al.*, 1991; LUTZ & SCHLATTER, 1992; SOHAL *et al.*, 1996). Isto

poderia sugerir que o efeito geral destas atividades de manutenção decorra da redução no dano oxidativo acumulado no DNA e em proteínas.

O aumento da expectativa de vida com conseqüente aumento da população idosa tem resultado em um aumento da população centenária, principalmente no Mediterrâneo (MECOCCI *et al.*, 2000). Esta população pode ser considerada como um exemplo de envelhecimento bem sucedido, cuja longevidade parece ser resultado de fatores genéticos, ambientais e imunoneuroendócrinos, capazes de manter esta população em homeostase e protegida de vários tipos de doenças relacionadas ao envelhecimento. O envelhecimento é caracterizado por um declínio de funções fisiológicas, com aumento na taxa de morbidade e mortalidade (MECOCCI *et al.*, 2000).

Durante os anos 90, foi verificado que a região do Mediterrâneo possuía uma das menores incidências de morte por doenças cardiovasculares e câncer, especialmente de intestino, pulmão e estômago, e um dos maiores índices de longevidade, quando comparados com populações nórdicas (Europa e América do Norte). Estes dados foram, mais tarde, relacionados com o tipo de dieta desta população, chamada de dieta do Mediterrâneo (TRICHOPOULOU & LAGIOU, 1999). Os principais componentes desta dieta são alta ingestão de óleo de oliva (constituído por altos teores de ácidos graxos monoinsaturados) moderado consumo de álcool, alta ingestão de legumes, verdura, cereais, em especial trigo e frutas, todos fontes dos principais antioxidantes. Além disto, a população apresenta baixa ingestão de carne e derivados e moderado consumo de leite e seus derivados. Apesar de não existirem evidências diretas que estes antioxidantes desempenham a principal ação benéfica da dieta do Mediterrâneo, evidências indiretas (dados epidemiológicos) sugerem, cada vez mais, a relação

entre os antioxidantes e a longevidade desta população (TRICHOPOULOU & LAGIOU, 1999). Sabe-se que os ácidos graxos monoinsaturados, presentes no azeite de oliva, aumentam a HDL-colesterol e são menos suscetíveis à peroxidação. Outros componentes importantes, são os polifenóis, que atuam como protetores da oxidação da LDL-colesterol, importante na fisiopatologia da aterosclerose. A alta ingestão de β -caroteno, vitaminas E e fibras através das frutas, legumes e verduras da dieta, contribui para diminuição do risco de doenças (TRICHOPOULOU & LAGIOU, 1999).

Numa análise sucinta da dieta dos países nórdicos, podemos observar uma alta ingestão de carne, leite e seus derivados, alto consumo de alimentos processados e em conservas, e alimentos contendo metais e aditivos, sugerindo que esta dieta, comparada à dieta do Mediterrâneo, contribui para maior incidência de morte por doenças cardiovasculares e câncer (PAPAS, 1999).

MECOCCI *et al.* (2000) para avaliar o *status* antioxidante de um grupo de indivíduos centenários saudáveis e de um outro grupo de idosos definidos como não centenários, determinaram os níveis plasmáticos de vitamina C, ácido úrico, vitE, vitA, carotenóides e grupos tióis. Também foram determinadas as atividades da SOD e da GPx. Os resultados mostraram a presença de altas concentrações de vitC e vitA, acompanhada da diminuição na atividade SOD nos indivíduos centenários saudáveis, sugerindo relação importante com a longevidade saudável. Nos indivíduos não centenários, foram encontrados baixos níveis de vitaminas e alta atividade das enzimas antioxidantes.

A combinação de vitE, β CT e selênio, utilizada na forma de suplementação no *Chinese Cancer Prevention Trial*, mostra-se associada com uma redução de

21% das mortes por câncer gástrico, e de 13% da mortalidade total (BLOT *et al.*, 1993).

Os efeitos dos antioxidantes sobre a média das concentrações de malondialdeído (MDA) foram avaliados em estudo realizado na Polônia envolvendo 100 pacientes e mostrou uma diminuição de 26% nos pacientes suplementados com 200 UI de α -tocoferol, 13% no grupo suplementado com 400 mg de vitamina C e 25% naqueles em que foi administrado a combinação dos dois antioxidantes (WARTANOWICZ *et al.*, 1984).

Um estudo na Finlândia demonstrou que as SRAT, apesar de inicialmente elevadas num grupo de idosos institucionalizados, diminuíram à concentrações semelhantes às de adultos jovens, após suplementação com α -tocoferol, vitaminas C, B₆, β -caroteno, selênio e zinco (TOLONEN *et al.*, 1985, 1988).

Os resultados do “*Cambridge Heart Antioxidant Study*” (CHAOS) estudo clínico de intervenção, duplo-cego e placebo controlado, realizado com 2002 pacientes portadores de doença arterial coronariana, mostraram redução de 77% no risco de infarto do miocárdio não fatal, após a administração de 400 ou 800 UI diárias de α -tocoferol. Este efeito benéfico foi observado após um período de 510 dias de tratamento (STEPHENS *et al.*, 1996).

Outro estudo clínico, observou os efeitos da administração de 50 mg de β -caroteno ou de 325 mg de aspirina versus placebo, em 22.071 médicos entre 40 a 84 anos. Após 12 anos de seguimento, não se observou nenhuma modificação no risco de doença cardiovascular ou câncer nos indivíduos que receberam β -caroteno. Entretanto, nos primeiros 5 anos de acompanhamento observou-se em uma sub-amostra de 333 pacientes portadores de doença arterial coronariana,

redução da mortalidade e de eventos coronarianos como o infarto, angioplastia e revascularização do miocárdio (GAZIANO *et al.*, 1991; HENNEKENS *et al.*, 1996).

MEYDANI *et al.* (1989) e mais tarde ASHOK e ALI (1998^b) sugeriram que a geração de ERO/ERN associada ao envelhecimento pode ser um fator que contribui para a depressão da resposta imune, documentada em roedores velhos e que a melhora do estado antioxidante pode ter um efeito imunestimulatório. Em estudo que avaliou o efeito da suplementação de α -tocoferol na resposta celular imune de idosos, os resultados indicaram uma significativa melhora da hipersensibilidade tardia no grupo suplementado. Outro dado interessante é que os indivíduos suplementados apresentaram uma melhora na resposta de linfócitos isolados à concanavalina A (MEYDANI *et al.*, 1990). Uma melhora nos parâmetros de resposta imunológica e uma menor incidência de doenças infecciosas foram observadas em grupo de idosos saudáveis, suplementado com vitaminas (CHANDRA, 1992).

MEYDANI *et al.* (1997) em estudo clínico duplo-cego, randomizado e controlado com placebo, administraram suplementos de vitE a idosos saudáveis, durante 4 meses, utilizando doses de 60mg, 200mg e 800mg, encontrando melhor resposta imune celular em todos pacientes suplementados, quando comparados ao grupo controle. Entretanto, esta resposta é significativamente maior naqueles indivíduos em que a concentração plasmática de α TC está em torno de 48,4 μ M. Interessante a observação que esta média de concentração plasmática de α TC é alcançada no grupo que recebe 200mg da substância ao dia.

Estudos experimentais, incluindo estudos com a espécie humana, têm sugerido a participação de ERO/ERN, produzidas no curso do metabolismo celular, como agentes influenciadores na patogênese de doenças e, também um

potencial efeito benéfico da ingestão de antioxidantes na redução do risco de desenvolvimento de câncer, afecções oculares degenerativas e doenças cardiovasculares (SLATER & BLOCK, 1991; AMES *et al.*, 1993; KRINSKY & SIES, 1995).

A peroxidação lipídica parece ser um importante mecanismo para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose, principal responsável pelo surgimento da doença arterial coronariana. Esta doença cardíaca apresenta maior incidência com o envelhecimento e constitui-se na causa mais freqüente de incapacidades e morte (STEINBERG *et al.*, BILD *et al.*, 1993)

Ainda que os avanços científicos e tecnológicos permitam, cada vez mais, o aumento do número de pessoas vivendo até idades próximas do limite biológico, permanece a dificuldade de se evitar doenças, o que contribui para o aumento do contingente de pessoas portadoras de problemas e deficiências crônicas (RAMOS, 1997). Portanto, com o aumento da expectativa de vida e da população idosa, estima-se que a prevalência de déficit cognitivo deva aumentar no mundo todo (JAMA, 1996; KALMIJN *et al.*, 1997).

Várias evidências experimentais indicam que um baixo potencial antioxidante pode ter papel relevante na etiologia da neurodegeneração e isquemia cerebral, as causas mais comuns de declínio cognitivo em pessoas idosas. Talvez, os antioxidantes possam reduzir o dano oxidativo causado pelas ERO/ERN, que induzem à formação e agregação de proteína β -A4 amilóide nos pacientes com demência de Alzheimer e síndrome de Down (DYRKES *et al.*, 1992). Estudos realizados vêm sugerindo a participação do estresse oxidativo nos mecanismos de degeneração neuronal. Estes trabalhos demonstram que mesmo os indivíduos idosos portadores de boa função cognitiva apresentam dano

oxidativo sobre mtDNA e proteínas cerebrais, quando comparados a adultos jovens; os portadores de demência de Alzheimer exibem níveis ainda maiores (MARKESBERY, 1997; MECOCCI & MacGARVEY, 1994).

Estudo epidemiológico realizado com japoneses americanos durante 4 anos demonstrou correlação negativa entre a suplementação com α -tocoferol e o baixo risco de déficit cognitivo (MASAKI *et al.*, 1994, 1995). PERRIG *et al.*, (1997) observaram relação entre a baixa ingestão de β -caroteno e o déficit cognitivo.

SANO *et al.* (1997) através de um estudo clínico multicêntrico, duplo-cego e controlado com placebo, avaliaram os efeitos da administração de altas doses de α -tocoferol e seligenina, na redução da progressão da demência de etiologia degenerativa, devido às doenças de Alzheimer e Parkinson. O estudo, com duração de 2 anos, envolveu 341 pacientes com comprometimento moderado da função cognitiva e os resultados sugerem que esses antioxidantes retardam a progressão da doença.

Com o envelhecimento, ocorrem algumas alterações no organismo que podem afetar a ingestão e o prazer pelos alimentos. A combinação de perdas gustativa e olfatória, diminuição do fluxo salivar, a dentição em mal estado de conservação e a redução da força mastigatória, freqüentemente encontradas entre os idosos, podem limitar a quantidade e variedade de alimentos a serem ingeridos (BEATTIE *et al.*, 1995). A mucosa gástrica é geralmente alterada com a idade, influenciando na absorção de certos nutrientes essenciais. Outros fatores ainda, como a presença de medicamentos, podem afetar a absorção de nutrientes. Na verdade, os estudos que avaliaram o estado nutricional de idosos sugeriram aumentado risco de desnutrição, causando um impacto no estado funcional desses indivíduos (ROSENBERG, 1995). Considerando todos estes

fatores citados acima, freqüentemente observado no idoso, relacionado com a limitação da ingestão de alimentos (quantidade e variedade) ou absorção torna-se necessário um acompanhamento clínico e nutricional diferenciado para o indivíduo idoso.

Muitos estudos acreditam que os antioxidantes, derivados da dieta, desempenham um importante papel na prevenção e tratamento de doenças crônicas, como a asma, doenças cardiovasculares, câncer e doenças relacionadas ao envelhecimento (BLOCK *et al.*, 1992; AMES, 1993; STAMPFER & RIMM, 1995).

Sabe-se que o estado físico de saúde não está totalmente associado com a baixa ingestão de nutrientes, sendo um melhor indicador do risco de má nutrição, o estado funcional do indivíduo (resultante de interação multidimensional entre saúde física, mental, capacidade de auto-cuidado, suporte familiar, integração social e independência econômica) (KANE & KANE, 1981; FILLENBAUM, 1984). Este dado sugere que a doença reduz o consumo de nutrientes essenciais somente quando a capacidade funcional e, possivelmente, a capacidade de comprar, cozinhar e comer os alimentos, está reduzida (YOUNG, 1983).

Em 1996, SNOWDON *et al.*, publicaram um estudo relacionando a concentração plasmática de antioxidantes (carotenóides e α -tocoferol) com a capacidade funcional reduzida de idosos, avaliando-se o nível de dependência funcional. O estudo, de desenho transversal, incluiu 88 freiras católicas residentes numa mesma moradia que se alimentavam da mesma fonte de preparo de alimentos e, também, recebiam cuidados de enfermagem de uma mesma equipe. Os autores descreveram uma direta relação entre a dependência para auto

cuidados e a concentração plasmática de licopeno, não encontrando relação semelhante com os outros carotenóides ou o α -tocoferol. Relataram que a redução em 30 $\mu\text{g/dL}$ na concentração plasmática de licopeno está associada com 2,4 dependências adicionais para o auto cuidado. No mesmo ano, outra publicação discutiu a presença do estresse oxidativo no envelhecimento, particularmente em idosos portadores de incapacidades (MEZZETTI *et al.*, 1996).

Um estudo de MEZZETTI *et al.*, (1996) comparando pacientes octagenários saudáveis com pacientes octagenários portadores de doenças e um grupo controle de adultos saudáveis, mostrou que o processo de envelhecimento por si só gera uma diminuição nos níveis plasmáticos de α -tocoferol, vitamina C e compostos tiólicos, associados a um aumento de produtos fluorescentes, derivados da oxidação de lipídios. Estas diferenças se tornam ainda mais pronunciadas no grupo de idosos com doenças incapacitantes (derrame, demência tipo Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose, artrite reumatóide, diabetes mellitus e hipertensão arterial sistêmica). Estes resultados indicam uma correlação estreita entre a defesa antioxidante do organismo e estado geral de saúde.

O potencial de envelhecimento saudável e prevenção de doença necessita do avanço dos conhecimentos sobre como oxidantes e antioxidantes afetam os sistemas biológicos (PACKER & CADENAS, 1999). É bastante provável que a administração de antioxidantes possa minimizar o dano oxidativo orgânico sofrido ao longo da vida e assim, melhorar a qualidade de vida do ser humano. Contudo, poucos são os estudos longitudinais de suplementação e avaliação cognitiva publicados até o momento, que venham contribuir com peso em revisões sistemáticas. Os que existem, geralmente, procuram avaliar o efeito de um ou

outro antioxidante, não sendo planejados para suprir toda a rede de antioxidantes. Como sabemos, os antioxidantes trabalham em conjunto e a capacidade antioxidante, *in vivo*, de um depende da atuação de muitos outros, constituindo um complexo sistema interligado. Adicionalmente, os estudos são desenhados para responder apenas questões como, morrer ou não e/ou apresentar ou não uma patologia específica. Esperamos que num futuro bastante próximo, a pesquisa possa obter consenso sobre o real valor do emprego de antioxidantes, definindo combinações apropriadas, parâmetros nutricionais, laboratoriais e clínicos, que em conjunto possam mostrar o papel benéfico, ou não, da suplementação antioxidante sobre a longevidade saudável.

OBJETIVOS

2. Objetivos

- 1) Estabelecer o valor de parâmetros relacionados ao estado de estresse oxidativo em uma população de idosos, avaliando-se
 - níveis de antioxidantes de baixo peso molecular no plasma, vitamina C (Vit C), α -tocoferol (α TC) e β -caroteno (β CT) assim como sua ingestão alimentar diária
 - atividade das enzimas antioxidantes eritrocitárias (SOD, CAT e GPx)
 - níveis de produtos derivados da oxidação de lipídios, mais especificamente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT)
 - atividade do *burst* oxidativo em neutrófilos sanguíneos.

- 2) Comparar o valor destes parâmetros com os de uma população adulta jovem

- 3) Suplementar esta população com antioxidantes de baixo peso molecular para observar modificações nos parâmetros acima.

MATERIAS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Desenho do Estudo

Em 1990 o Centro de Estudos do Envelhecimento da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (CEE) iniciou projeto temático denominado "Epidemiologia do Idoso" (EPIDOSO) que teve como proposta o seguimento de um coorte de idosos residentes em zona urbana do município de São Paulo, por um período de 10 anos . Este projeto caracterizou-se por ser um estudo longitudinal, prospectivo, desenvolvido no bairro de Vila Clementino, uma região de classe sócio-econômica média, localizado na área de captação do CEE.

Os objetivos do projeto EPIDOSO foram os de avaliar a capacidade funcional dos idosos e identificar fatores de risco para a mortalidade geral que possam ser incorporados ao atendimento clínico desses pacientes, no nível primário de atenção à saúde. Foram considerados indivíduos idosos, para esse projeto, aqueles com idade igual ou superior a 65 anos (WHO, 1989).

Os idosos identificados na região mencionada foram arrolados e convidados a participar do projeto. O seguimento teve início em 1992 e envolveu entrevista domiciliar, avaliação clínica no CEE e retorno para a coleta de exames laboratoriais. A metodologia que foi repetida em 1994, 1996, 1998 e 2000.

Em 1996, uma sub-amostra aleatória dos idosos, que já se encontravam em seguimento ambulatorial por equipe multiprofissional (médico, nutricionista, fisioterapeuta, fonoaudiólogo e psicólogo) (RAMOS *et al.*, 1998) foi novamente contatada, com a finalidade de se avaliar a relação do estresse oxidativo com a capacidade funcional do idoso e analisar os efeitos de uma suplementação de antioxidantes nesta mesma população, projeto aprovado pela Comissão de Ética

da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina sob número 301/97 (Anexo I).

3.1.1. Casuística

Os pacientes incluídos no presente estudo, recebendo orientações quanto à sua saúde, especialmente do ponto de vista clínico e nutricional nos últimos 4 anos, foram avaliados clínica, nutricional e laboratorialmente.

Inicialmente foram submetidos a um inquérito clínico realizado por geriatra, composto de anamnese, exame físico, avaliação da função cognitiva e do nível de dependência física para a realização das atividades de vida diária. Aqueles pacientes com antecedentes de tabagismo nos últimos 5 anos e aqueles que faziam uso regular de suplementos vitamínicos nos últimos 6 meses que precederam a realização do inquérito clínico, não foram incluídos neste estudo.

Os 90 pacientes selecionados foram então avaliados nutricional e laboratorialmente, enfatizando-se a determinação de parâmetros pró- e antioxidantes.

Com o objetivo de estudar o comprometimento do *status* de estresse oxidativo da população idosa, utilizamos um grupo de indivíduos adultos jovens saudáveis. As informações gerais dos grupos de indivíduos encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 – Informações gerais dos 2 grupos de indivíduos estudados

Parâmetro	Indivíduos Idosos	Indivíduos Jovens
Idade (anos) [#]	70-91	40-49
Sexo (M/F)	45/45	58/60
Total de Indivíduos	90	118

[#] Os dados apresentados representam valores mínimos e máximos.

A seguir estes idosos foram agrupados em 2 grupos de acordo com o tratamento a que foram submetidos: Tratamento 1 (T1) - os idosos do grupo T1 receberam uma suplementação vitamínico-mineral (*) durante 90 dias, seguidos de 100 dias de *washout* (período em que os parâmetros medidos retornam para os valores basais) e, logo após, 90 dias de suplementação placebo. Tratamento 2 (T2) - os idosos do grupo T2 receberam, inicialmente, suplementação placebo durante 90 dias, seguidos de 100 dias de *washout* e, finalmente, 90 dias de suplementação vitamínico-mineral, figura (9).

A fase 1 do estudo ficou definida como sendo os primeiros 90 dias tanto de T1 quanto de T2. No início da fase 1 foi realizada a primeira coleta de amostras de sangue para as determinações dos parâmetros estudados (valores basais). Antes mesmo do início da fase 1 constatou-se uma perda de 14 pacientes por distintas razões: mudança de residência para outra região, falecimento ou recusa em continuar no protocolo. Assim, o grupo T1 iniciou a fase 1 com 33 idosos e o grupo T2 com 43 idosos. No final da fase 1 foi realizada a segunda coleta seguida de nova medida dos parâmetros já citados. A fase 2 do estudo foi definida como sendo os últimos 90 dias de T1 e T2, etapa posterior ao período do *washout* dos 2 grupos. Entretanto, ainda no final da fase 1 foram recebidas mais 18 recusas, o que fez com que o grupo T1 iniciasse a fase 2 com 25 idosos e o grupo T2, com 33 idosos. Nova perda de seguimento (10 pacientes) foi constatada durante a fase 2. A fase 2 foi concluída, com a realização da terceira coleta, com 21 idosos no grupo T1 e 27 idosos no grupo T2, figura (9).

* A suplementação vitamínico-mineral, oral e diária, oferecida tanto no tratamento 1 quanto no 2 consistiu de: 800 mg de α -tocoferol; 2 g vitamina C; 15 mg de β -caroteno e 100 μ g de selênio. Os pacientes foram aconselhados à usar

as 2 g de vitamina C junto ao café da manhã e, o restante, junto com a refeição do almoço.

Figura 9: Esquema de suplementação vitamínico-mineral

3.2. Inquérito clínico

A avaliação clínica foi realizada por geriatra, seguindo o protocolo clínico desenvolvido no CEE (Anexo II) e que realiza uma avaliação multidimensional do idoso (TONIOLO NETO, 1993). Nesta avaliação foi dada ênfase à pesquisa de dois importantes critérios para designação da capacidade funcional do idoso: o nível de dependência física e a função cognitiva (FOLSTEIN *et al.*, 1975; RAMOS, 1997).

3.3. Inquérito nutricional

O inquérito nutricional foi realizado com a finalidade de estimar a ingestão diária de vitamina C, vitamina E, β -caroteno e selênio. Para a vitamina C, β -caroteno e selênio, a técnica empregada foi o questionário de frequência de consumo alimentar induzido, composto por uma lista de 17 alimentos, fontes desses micronutrientes e que fazem parte do hábito alimentar dessa população. Para a vitamina E foi utilizado o método de frequência do consumo de alimentos (JELLIFFE & JELLIFFE, 1989; GIBSON, 1990; NAJAS, 1994) (Anexo III).

O inquérito nutricional foi aplicado nas fases inicial e final deste estudo.

3.4. Inquérito laboratorial

3.4.1. Tratamento e coleta das amostras de sangue

Amostras de sangue dos participantes foram obtidas em três momentos deste estudo: início (antes da suplementação) final da fase 1 e final da fase 2 da suplementação. Estas amostragem foi realizada após 12 horas de jejum, sendo sido sangue venoso colhido em heparina (2 tubos de 10 mL).

Um dos tubos foi centrifugado e o plasma separado. Após separação do plasma, os eritrócitos foram resuspensores em tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (PBS) centrifugados a 500 x g por 10 minutos, entre 0°C e 4°C. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. O sedimento de eritrócitos, *pellet*, resultante da última lavagem foi então hemolisado para a avaliação da atividade de enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e medida da concentração de hemoglobina.

Amostras de plasma (500 μ L) foram armazenadas a -80°C, para posterior determinação de α -tocoferol, β -caroteno e vitamina C. O plasma também foi utilizado para a determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT).

O conteúdo do segundo tubo coletado foi transferido para tubo plástico e cônico e foi utilizado para separação de neutrófilos e avaliação do *burst* oxidativo.

3.4.2. Medida de parâmetros de estresse oxidativo

3.4.2.1. Avaliação das enzimas antioxidantes eritrocitárias

A – Preparo do hemolisado

A 0,4 mL do *pellet* eritrocitário lavado foram adicionados 3,6 mL de solução hemolisante (β -mercaptoetanol 0,7mM, EDTA 2,7mM, pH 7,0) (BEUTLER, 1975). O tubo contendo esta mistura foi imerso em uma mistura de gelo seco-acetona até o completo congelamento. Logo a seguir foi descongelado a temperatura ambiente. Esta etapa foi repetida 3 vezes e ao final o hemolisado foi centrifugado a 27000 x g por 30 minutos, em centrífuga refrigerada. A fração sobrenadante constituiu o hemolisado e foi utilizado para medir a atividade das enzimas. Para o cálculo das atividades específica determinou-se a concentração de hemoglobina nos hemolisados.

B – Dosagem de Hemoglobina

A quantidade de hemoglobina (Hb) nos hemolisados foi determinada usando solução de Drabkin modificada (VAN KAMPEN & ZIJLSTRA, 1961). Neste método, os compostos de Hb, com exceção da sulfahemoglobina, são rapidamente convertidos à cianometahemoglobina, sob a ação de cianeto e

ferricianeto de potássio. Para a determinação da concentração de Hb foram adicionados 100 μ L dos hemolisados de eritrócitos a 5,0 mL de solução de Drabkin modificada. Após 5 minutos à temperatura ambiente, a leitura de absorbância foi realizada no comprimento de onda de 540 nm, contra um branco do reativo. O cálculo final da concentração de Hb foi realizado utilizando-se um fator de calibração, obtido através de curva padrão, de Hb comercial (Labtest). A concentração de Hb nos hemolisados, foi expressa em mg/ mL.

C – Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

Cu,Zn-Superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1)

A atividade desta enzima foi determinada segundo o método descrito por McCORD & FRIDOVICH (1969). O sistema gerador de ânion superóxido é a reação catalisada pela xantina oxidase, que ao promover a transformação de xantina em ácido úrico, transfere um elétron para o O_2 molecular, produzindo $O_2^{\bullet-}$. Esta reação é acoplada à redução do citocromo c pelo $O_2^{\bullet-}$, medindo-se o aumento de absorbância em 550 nm, a 25°C. A adição de superóxido dismutase (SOD) promove uma inibição na velocidade de redução de citocromo c, uma vez que a SOD compete com o citocromo, pelo $O_2^{\bullet-}$, dismutando-o a H_2O_2 . A atividade da Cu,Zn-SOD foi medida na presença de cianeto de potássio 20 mM, inibindo-se assim a atividade da citocromo c oxidase (LOMBARDI *et al.*, 1992).

O meio de reação continha citocromo c 10 mM, xantina 50 mM, EDTA 0,1 mM, KCN 20 mM e tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8. A xantina oxidase foi diluída em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 de modo a promover uma variação de absorbância de 0,030 por minuto, que corresponde a uma

inibição na velocidade de redução de citocromo c pelo $O_2^{\bullet-}$, entre 20 e 40%, no meio de reação sem amostra.

Os resultados foram expressos em Unidades/ mg de Hb. Uma unidade (U) de SOD foi definida como a quantidade da enzima que promove 50% de inibição na redução do citocromo c, por minuto, a 25°C, em pH 7,8.

Catalase (E.C. 1.11.1.6)

A catalase (CAT) é uma enzima que promove a decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 . A técnica empregada para medir a sua atividade foi descrita por BEUTLER (1975) que quantifica a velocidade de decomposição da H_2O_2 pela enzima, através do decréscimo de absorbância a 230 nm ($\epsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a 37°C. O meio de reação continha H_2O_2 10 mM, Tris 1 M e EDTA 5 mM, pH 8,0. Os valores de atividade da catalase foram expressos em U/ mg de Hb. Uma unidade de catalase corresponde a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de H_2O_2 / minuto, a 37°C, em pH 8,0.

Glutathione peroxidase (E.C. 1.11.1.9)

A glutathione peroxidase (GPx) catalisa a redução do H_2O_2 , bem como de outros hidroperóxidos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como co-substrato, produzindo glutathione oxidada (GSSG). A atividade da GPx no hemolisado foi medida pela técnica descrita por SIES *et al.* (1979) método que baseia-se na medida do decréscimo de absorbância, promovido durante a redução da GSSG, catalisada pela glutathione redutase, em presença de NADPH. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir

de GSH, em presença de peróxido, catalisada pela GPx ($\epsilon=6,22\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). O meio de reação continha tampão Tris.HCl 0,1M EDTA 0,5mM, pH 8,0, NADPH 20 mM, glutathione redutase 0,1 U/mL e glutathione reduzida 0,1 M.

A 1,0 mL do meio de reação foram adicionados volumes variáveis do hemolisado diluído no mesmo tampão. Após 2 minutos, foram acrescentados 10 μL de peróxido de ter-butila (*t*-BOOH) 0,5 mM. A absorbância foi registrada no comprimento de onda de 340 nm, a 37°C. Os resultados foram expressos em U/ g de Hb, onde uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que oxida 1 μmol de NADPH/ minuto, a 37°C, em pH 8,0.

3.4.2.2. Avaliação de antioxidantes de baixo peso molecular

A – Medida da concentração plasmática de α -tocoferol e β -caroteno

Preparo dos padrões

Os padrões de α -tocoferol e β -caroteno foram dissolvidos em clorofórmio e diluídos em etanol para uma concentração final de aproximadamente 1 μM (MOTCHINIK *et al.*, 1994). A concentração precisa de cada solução padrão foi determinada espectrofotometricamente utilizando os seguintes coeficientes de extinção:

α -tocoferol	292 nm	$\epsilon^{1\%} = 75.8 \text{ litros.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	P.M.: 430.6
β -caroteno	453 nm	$\epsilon^{1\%} = 2620 \text{ litros.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	P.M.: 536.9

Ambos os padrões se mantiveram estáveis por vários meses a - 80°C.

Determinação de α -tocoferol e β -caroteno

A concentração plasmática de α -tocoferol e β -caroteno foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) após extração destas vitaminas com hexano (LANG *et al.*, 1986). O procedimento utilizado para a extração do plasma foi o descrito por Burton (BURTON *et al.*, 1985) e por nós modificado. Uma alíquota de 100 μ L de plasma foi agitada em vórtex por 30 segundos com 300 μ L de metanol e adicionado 4 mL de hexano. Após nova agitação em vórtex por 2 minutos, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 1000 x g para a separação das camadas. Uma alíquota de 2,5 mL da camada de hexano (superior) foi transferida para outro tubo e seca sob nitrogênio. O resíduo da secagem foi resuspenso em 0,5 mL de metanol:etanol 1:1 (v/v) e filtrado (poro 0.22 μ m).

A análise dos antioxidantes extraídos do plasma foi realizada por HPLC utilizando-se um detector eletroquímico com potencial de oxidação de 0,6 V, acoplado a um sistema isocrático de distribuição Waters 510 (BUTTRISS & DIPLOCK, 1984). As amostras foram injetadas através de um sistema Rheodyne (loop de 20 μ L) em uma coluna C-8 Nova Pak de 4 μ m (3,9 x 150 mm) com fluxo de fase móvel de 1,0 mL/min. A fase móvel se consistiu de uma solução de 20 mM de perclorato de lítio em metanol/água 98:2 (v/v). Os picos foram analisados contra os padrões de cada vitamina, utilizando os respectivos tempos de retenção (α -tocoferol: 3.14 min; β -caroteno: 8.32min). As quantidades de cada antioxidante foram calculadas por comparação entre a área da amostra e a área do respectivo padrão, de concentração conhecida. Os resultados foram expressos em μ M.

A figura (10) mostra cromatogramas típicos obtidos para a medida dos antioxidantes lipossolúveis. (A) Padrões; (B) Amostra de plasma.

Figura 10 A: Cromatograma dos padrões de α -tocoferol e β -caroteno para a obtenção das concentrações plasmáticas destes antioxidantes, obtidos conforme descrito em materiais e métodos (3.4.2.2. item A).

Figura 10 B: Cromatograma dos antioxidantes, α -tocoferol e β -caroteno, obtido após as suas extrações de amostra plasmática, descrito em materiais e métodos (3.4.2.2. item A).

B – Medida da concentração plasmática de vitamina C

A determinação da concentração plasmática de vitamina C foi realizada de acordo com Wagner *et al.* (1979).

As amostras de plasma, previamente armazenadas a -80°C (máximo 5 dias) foram extraídas com ácido metafosfórico (HPO_3) 10% (300 μL de amostra em 900 μL de HPO_3) agitadas em vórtex por 30 segundos e centrifugadas por 5 minutos a $15.600 \times g$. Após a diluição do sobrenadante na fase móvel (200 μL do sobrenadante em 600 μL de ácido metafosfórico 0,8 %) as amostras foram filtradas em membrana de poro 0,22 μm , injetadas em sistema Rheodyne (*loop* de 20 μL) e em coluna C -18 $\mu\text{Bondapak}$ (3,9 x 300 mm) com fluxo de fase móvel de 0,7 mL/min. A fase móvel se consistiu de uma solução de ácido metafosfórico 0,8%, preparada em água MiliQ. A determinação foi realizada com auxílio de um detector UV/visível no λ : 235 nm. Os picos foram analisados contra o padrão da vitamina C injetado no mesmo dia. A concentração de vitamina C na amostra foi calculada por comparação entre a área da amostra e a área do padrão, de concentração conhecida. Os resultados foram expressos em μM .

A figura (11) mostra cromatogramas típicos obtidos para a medida da concentração plasmática da vitamina C. (A) Padrão; (B) Amostra de plasma.

Figura 11 A e B: Cromatogramas: (A) padrão de Vit C e (B) da vitamina C após a extração de amostra plasmática, obtidos conforme descrito em materiais e métodos (3.4.2.2 item B).

3.4.2.3. Medida da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT) no plasma.

Esta técnica determina, colorimetricamente, o produto de reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e os aldeídos produzidos durante a oxidação de lipídios. O procedimento utilizado foi o descrito por OHKAWA, *et al.* (1979). O TBA foi dissolvido em ácido tricloroacético 20% (TCA) sob agitação. Em seguida, alíquotas de 1mL da mistura acima foram acrescidas de 200 μ L de plasma e levadas a um banho-maria por 20 minutos. Logo após foram resfriadas em banho de gelo por 20 minutos, centrifugadas a 12.000 x g e a absorbância do sobrenadante foi registrada a 535 nm. Amostras de plasma contendo apenas TCA

e, tratadas da mesma forma, foram utilizadas como branco para a reação. Os resultados foram expressos por η moles de SRAT/ mL de plasma.

3.4.2.4. Avaliação do *burst* oxidativo de neutrófilos sangüíneos humanos, medida por quimioluminescência (QL) amplificada por luminol

A – Obtenção dos neutrófilos

Os neutrófilos foram isolados do sangue total por centrifugação em gradiente de densidade, utilizando Hystopaque-1077. Após centrifugação a 600 x g por 20 minutos a temperatura ambiente, o plasma foi retirado. A sedimentação dos eritrócitos foi realizada através da resuspensão em Dextran, deixando as amostras em repouso por 30 min. Em seguida, o sobrenadante foi separado e centrifugado a 600 x g, por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* continha neutrófilos e alguns eritrócitos contaminantes. A hemólise dos eritrócitos contaminantes foi realizada com água gelada por 120 segundos, adicionando-se em seguida NaCl 2,7% e PBS (BOYUM, 1968). Os neutrófilos obtidos, após centrifugação a 500 x g por 15 min a 4°C, foram lavados mais uma vez e resuspenso com 1,0 mL de tampão PBS adicionado de glicose (100 mg/mL) e mantidos em banho de gelo. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer (> 95% de neutrófilos) e o teste de viabilidade, pelo método de azul de Tripán (exclusão do corante).

B – QL de neutrófilos amplificada por luminol

A luminescência é a emissão de luz por um processo não-térmico. No caso particular da QL a luz é produzida através de uma reação química. As moléculas responsáveis pela emissão de luz absorvem energia liberada por reações químicas e tornam-se excitadas. Neste estado, alguns elétrons periféricos da molécula vão para um nível energético mais alto. Perdendo energia, esses elétrons retornam a um nível energético mais baixo. Esta energia perdida é emitida como fótons e medida como luz (TRUSH *et al.*, 1978; ALLEN, 1986).

A QL ou emissão de fótons por neutrófilos ativados, quer pela fagocitose, quer por outros estímulos, foi descrita pela primeira vez por Allen (ALLEN *et al.*, 1972). Os oxidantes produzidos por estas células irão oxidar substratos endógenos, formando intermediários de vida curta, com capacidade de emitir luz de baixa intensidade, denominada de QL nativa (FRITZCHE & DEVECK, 1988). O *burst* oxidativo produzido por neutrófilos ativados está diretamente relacionado à sua capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, no intuito de matar os microrganismos fagocitados, além de submeter o meio externo a intenso estresse oxidativo, como demonstrado em vários ensaios sob condições distintas (ALLEN, 1986). Com o objetivo de aumentar a produção de luz, obtendo-se assim, uma reação de maior sensibilidade, o composto luminol (5-amino-2, diidro-1,4-ftalazinediona) tem sido utilizado como um agente amplificador da QL produzida pelas células (STEVENS, 1987). O mecanismo de reação do luminol baseia-se na sua oxidação a um intermediário que, subseqüentemente, converte-se ao produto aminoftalato, com emissão de luz no espectro visível 450 nm (ALLEN, 1986) figura (12).

O estímulo utilizado foi o zimosan (Zy). Este é preparado a partir da parede de leveduras e, quando recoberto por opsoninas do soro é reconhecido por receptores de membrana de fagócitos, ocorrendo então, a ingestão da partícula e a ativação do *burst* oxidativo (VAN DYKE, 1987)

Figura 12: Representação esquemática da oxidação do luminol, que resulta na produção de fótons.

C – Preparo do zimosan

O Zy foi diluído em tampão PBS (0,01M, pH 7,4) e fervido durante 1 hora sob agitação. Após o resfriamento, a solução foi sonicada e centrifugada a 500 x g por 5 min a 4°C. O *pellet* foi resuspenso em tampão PBS 0,01M, pH 7,4 e centrifugado a 500 x g por 10 min a 4°C. Este procedimento foi repetido mais 2 vezes. Finalmente, as partículas foram resuspensas no mesmo tampão a uma concentração final de 10 mg/mL e contadas em câmara de Neubauer (WALKER *et al.*, 1981). O Zy foi estocado a -80°C.

Opsonização do Zy: Usar *pool* de soro humano colhido no dia. Misturar 3mL do *pool* de soro com 1mL da suspensão de Zy (10 mg/mL) incubar à 37°C por 60 min, sob agitação constante. Centrifugar a 500 x g por 10 min à 4°C. Retirar o sobrenadante e lavar o *pellet* com PBS, centrifugar a 500 x g por 10 min à 4°C. Ressuspender o *pellet* com 3mL de PBS e aliquotar em eppendorf. O Zy opsonizado foi estocado a -80°C.

D – Preparo do luminol

A solução estoque de luminol foi preparada pela dissolução de 1,77 mg de luminol em 1mL de DMSO para atingir uma concentração de 10^{-2} M. Antes do uso, a solução foi diluída em PBS para uma concentração de 10^{-4} M.

E – Ensaio

Utilizando-se um número constante de neutrófilos (1×10^5 células/mL) acrescentou-se luminol 10^{-4} M e Zy opsonizado (200 partículas/neutrófilo). O volume do tubo de reação foi completado com PBS para 1mL. A linha base de cada amostra foi obtida sem a adição de Zy. A emissão de luz foi medida em um luminômetro BIO-ORBIT 1251, com agitação constante e temperatura controlada a 37°C, produzindo curvas de luminescência (DECHALET *et al.*, 1982; EASMON *et al.*, 1980; HALSTENSEN *et al.*, 1986; CHAN *et al.*, 1998). Os resultados foram expressos como velocidade máxima de emissão de luz ($\text{mV} \times \text{min}^{-1}$) e emissão total de luz até o pico ($\text{mV} \times \text{min}$) dada pela integral da área da curva de luminescência, do tempo zero até o pico. A figura (13) representa curvas típicas de luminescência obtidas em dia de experimento.

Figura 13 : Curvas típicas de luminescência obtidas em dia de experimento. A curva AS foi obtida a partir de neutrófilos isolados e estimulados por Zy. A curva C/C representa a linha de base desta amostra (sem estímulo).

3.5. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o teste *t* de Student para amostras independentes. O teste *t* foi usado na comparação, de cada parâmetro, entre T1 e T2. A análise de variância ANOVA foi usada para a consistência basal e a comparação entre os valores basais, placebo e vitamina, dentro de cada tratamento; seguido do teste de Bonferroni para múltiplas comparações entre as médias dentro do mesmo tratamento (ZHAR, 1996). Para a verificação de correlações foi usado o teste de correlação bivariada de Pearson. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0.05$.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Inquérito nutricional

Os valores médios para a ingestão diária de vitE, vitC, e β CT obtidos através inquérito nutricional estão na tabela 2, para ambos os grupos estudados.

Tabela 2 – Inquérito Nutricional: valores de ingestão diária de antioxidantes*

Parâmetro	Idosos (n:90)	Jovens (n: 118)	RDA (mg)
Vitamina E (mg) P	25.7 $\pm$ 13.4	12.1 $\pm$ 0.11 0.001	10.0
Vitamina C (mg) P	233 $\pm$ 152	165 $\pm$ 108 0.002	60.0
β -caroteno (mg) P	6.6 $\pm$ 4.9	3.01 $\pm$ 0.22 0.000	5.2

* Os dados são apresentados como Média $\pm$ Desvio Padrão, onde n representa o número de indivíduos. As diferenças estatísticas foram encontradas utilizando-se teste t para amostras independentes e consideradas significantes para $p < 0,05$.

Podemos observar que as médias da ingestão de vitE, vitC, e β CT encontradas no grupo de idosos são significativamente maiores (112%, 41% e 119%, respectivamente) do que as médias encontradas para o grupo adulto jovem (tabela 2). Estas, são maiores que as respectivas recomendações dietéticas diárias (R.D.A) sugeridas pelo "Food and Nutricional Board" (1989) com exceção da média da ingestão de β CT obtida para o grupo adulto jovem.

4.2. Avaliação dos níveis plasmáticos de antioxidantes de baixo peso molecular

A concentração plasmática de α TC, β CT e vitC foram determinadas por HPLC conforme descrito em materiais e métodos. A tabela 3 mostra as médias das concentração plasmáticas destes antioxidantes obtidas para os dois grupos estudados.

Tabela 3 – Níveis plasmáticos de antioxidantes de baixo peso molecular*

Parâmetro	Idosos	Jovens
α - tocoferol (μ M) p	19.9 $\pm$ 7.9 (90)	29.0 $\pm$ 9.8 (118)
		0.001
Vitamina C (μ M) P	37 $\pm$ 17 (90)	58 $\pm$ 10 (118)
		0.01
α - tocoferol (η mol/mg colesterol LDL)* p	13.7 $\pm$ 5.9 (64)	26.6 $\pm$ 8.7 (118)
		0.001
β -caroteno (μ M) p	0.89 $\pm$ 0.70 (90)	1.31 $\pm$ 0.44 (118)
		0.000
β -caroteno (η mol/mg colesterol LDL) * p	0.51 $\pm$ 0.39 (64)	1.20 $\pm$ 0.36 (118)
		0.000

* Os dados de cada parâmetro estão apresentados como Média $\pm$ Desvio Padrão e o número entre parênteses representa o número de indivíduos estudados. As diferenças estatísticas foram encontradas utilizando-se teste t para amostras independentes e consideradas significantes para $p < 0,05$. *Os antioxidantes α TC e β CT foram corrigidos pelos valores de LDL-colesterol, obtidos por análise bioquímica do sangue dos pacientes.

As médias das concentrações plasmáticas de α TC, β CT e vitC, obtidas do grupo idoso são, significativamente menores (-31%, -32% e -36%, respectivamente) que aquelas obtidas para o grupo de adultos jovens, tabela 3.

Já os valores de α TC e β CT corrigidos por mg colesterol na LDL são menores 52% e 43%, respectivamente, que os do grupo de jovens.

4.3. Correlação entre níveis plasmáticos e ingestão de antioxidantes da população idosa

Utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson para a análise, observamos que não há correlação significativa entre as médias dos níveis plasmáticos de α TC e β CT e a ingestão diárias destes antioxidantes (tabela 4). No caso da vitC a correlação entre os níveis plasmáticos e a ingestão diária é positiva e estatisticamente significativa (tabela 4).

Tabela 4 – Correlação entre níveis plasmáticos e ingestão de antioxidantes

	Coeficiente de correlação de Pearson	p
Vitamina C	0.268	0.014
Vitamina E	-0.084	0.499
β-caroteno	0.213	0.053

4.4. Atividade específica das enzimas eritrocitárias antioxidantes

A tabela 5 mostra a atividade específica das enzimas CuZn-SOD, CAT e GPx determinadas nos grupos de indivíduos, idosos e jovens. A atividade específica de cada enzima esta representada pela média das atividades obtida em cada grupo de indivíduos estudado. Analisando os resultados da tabela 5, observamos que as médias das atividades específicas da SOD, CAT e GPx são

significativamente maiores (20%, 27% e 30%, respectivamente) no grupo idoso, do que as médias das atividades medidas no grupo jovem.

Tabela 5 – Atividade específica das enzimas eritrocitárias antioxidantes [#]

Parâmetro	Idosos (n: 90)	Jovens (n: 118)
CuZnSOD (U/mg Hb) p	5.68 ± 1.35	4.74 ± 0.87 0.048
Catalase (U/mg Hb) p	197 ± 58	155 ± 33 0.031
Glutathione peroxidase (U/g Hb) p	21.29 ± 7.74	16.39 ± 3.69 0.007

[#] Os dados de cada parâmetro estão apresentados como Média ± Desvio Padrão e o número entre parênteses representa o número de indivíduos estudados. As diferenças estatísticas foram encontradas utilizando-se teste t para amostras independentes e consideradas significantes para $p < 0,05$.

4.5. Níveis plasmáticos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT)

A tabela 6 mostra os valores da média dos níveis plasmáticos de SRAT obtidos em cada grupo estudado, idosos e jovens.

No grupo dos idosos, a média da concentração plasmática de SRAT é 34% maior que a encontrada para o grupo de adultos jovens (Tabela 6).

Tabela 6 – Níveis plasmáticos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol SRAT/mL plasma) [#]

Idosos (n: 90)	Jovens (n: 118)	p
3.09 ± 2.28	2.30 ± 0.65	0.001

[#] Os dados estão apresentados como Média ± Desvio Padrão, onde n representa o número de indivíduos estudados. As diferenças estatísticas foram encontradas utilizando-se teste t para amostras independentes, e consideradas significantes para $p < 0,05$.

4.6. Correlação entre níveis plasmáticos de antioxidantes e atividade do *burst* oxidativo de neutrófilos sangüíneos da população idosa

A atividade do *burst* oxidativo de neutrófilos foi determinada pela produção de ERO/ERN medida por quimioluminescência (QL) amplificada por luminol produzida por neutrófilos sangüíneos após serem estimulados por Zy opsonizado. Para a avaliação do *burst* oxidativo foram utilizados dois parâmetros de medida, a velocidade máxima de emissão de luz, depois do estímulo ($\text{mV} \times \text{min}^{-1}$) e a integral (área) de emissão de luz, obtida do tempo zero até a emissão máxima de luz ($\text{mV} \times \text{min}$). Podemos observar uma correlação positiva entre *burst* oxidativo de neutrófilos sangüíneos e a concentração plasmática de vitC, conforme demonstra a tabela 7. Não foi observada nenhuma correlação significativa entre os níveis plasmáticos de αTC , βCT e os parâmetros do *burst* oxidativo dos neutrófilos.

Tabela 7 – Correlação entre níveis plasmáticos de antioxidantes e atividade do *burst* oxidativo de neutrófilos sangüíneos da população idosa

	Coefficiente de correlação de Pearson	p
Vitamina C x velocidade¹	0.306	0.010
Vitamina C x área²	0.462	0.000
Vitamina E x velocidade	0.031	0.800
Vitamina E x área	0.127	0.296
β-caroteno x velocidade	- 0.144	0.235
β-caroteno x área	- 0.062	0.612

¹velocidade máxima de emissão de luz depois do estímulo;

²integral de emissão de luz (de tempo zero até o pico de emissão de luz).

4.7. Avaliação da suplementação vitamínica na população idosa

4.7.1. Teste de consistência dos valores iniciais das concentrações plasmáticas dos antioxidantes

Como foi descrito em Materiais e Métodos (3.1.1) o tamanho amostral variou bastante durante todo o estudo. Assim, para verificar a influência das desistências nas distintas fases do estudo e saber se, ainda assim, a amostra final estudada era representativa da população e, os valores iniciais das médias dos antioxidantes não seria afetado pelas desistências, aplicou-se o teste ANOVA a todos os grupos, para cada parâmetro medido.

Os resultados da tabela 8 mostram que não há diferença, estatisticamente significativa, entre as médias das concentrações dos antioxidantes dos idosos incluídos no estudo, entre os que concluíram as duas fases e aqueles que não concluíram o estudo, conforme mostra a figura 14. Este procedimento foi repetido para todos os parâmetros estudados e concluímos que as desistências (ocorridas por razões variadas) não modificaram os parâmetros basais da população que terminou o estudo.

Tabela 8 – Estudo da consistência das concentrações plasmáticas basais de antioxidantes de baixo peso molecular: valores de todos os indivíduos incluídos no protocolo e dos indivíduos que não concluíram as duas fases do estudo[#]

	Vitamina C (μM)	α-tocoferol (μM)	β-caroteno (μM)
População Total (n: 90)	37 $\pm$ 2	19.9 $\pm$ 0.8	0.89 $\pm$ 0.07
Fase 1			
Indivíduos agrupados em T1 (n: 33)	39 $\pm$ 20	21.9 $\pm$ 7.8	0.95 $\pm$ 0.80
Indivíduos agrupados em T2 (n: 43)	37 $\pm$ 16	19.6 $\pm$ 7.4	0.92 $\pm$ 0.68
Dropout (n: 14)	35 $\pm$ 14	16.1 $\pm$ 8.7	0.69 $\pm$ 0.55
P	0.71	0.70	0.50
Concluíram Fase 1			
Indivíduos agrupados em T1 (n: 25)	36 $\pm$ 20	21.9 $\pm$ 7.1	0.93 $\pm$ 0.89
Indivíduos agrupados em T2 (n: 33)	40 $\pm$ 17	20.3 $\pm$ 6.9	0.95 $\pm$ 0.74
Dropout (n: 18)	35 $\pm$ 15	17.9 $\pm$ 9.2	0.80 $\pm$ 0.48
P	0.65	0.17	0.68
Concluíram Fase 2			
Indivíduos agrupados em T1 (n: 21)	34 $\pm$ 15	21.7 $\pm$ 6.7	0.98 $\pm$ 0.95
Indivíduos agrupados em T2 (n: 27)	40 $\pm$ 17	21.2 $\pm$ 6.9	0.89 $\pm$ 0.76
Dropout (n: 10)	37 $\pm$ 18	18.1 $\pm$ 8.8	0.85 $\pm$ 0.52
P	0.43	0.14	0.80

[#] Os dados estão apresentados como Média $\pm$ Desvio Padrão, com o número de indivíduos de cada grupo entre parênteses (n). A significância das diferenças nos níveis plasmáticos dos antioxidantes, dentro das diversas fases do estudo, foram analisadas estatisticamente pelo teste de ANOVA.

4.7.2. Níveis plasmáticos de antioxidantes de baixo peso molecular antes e depois da suplementação

A tabela 9 mostra as médias das concentrações plasmáticas de antioxidantes (vitC, α TC e β CT) obtidas nos grupos de idosos que concluíram o estudo T1(n=21) e T2 (n=27) nas seguintes condições: antes da suplementação (definida como basal) depois da suplementação (definida como vitamina) e depois do placebo.

Tabela 9 – Níveis plasmáticos de antioxidantes de baixo peso molecular antes e depois da suplementação [#]

Parâmetro	Antes Suplementação	Depois Suplementação (vitamina)	Placebo	Diferenças entre vitamina e placebo
Vitamina C (μM)				
Concluíram T1 (n:21)	34 ± 15	62 ± 18	30 ± 20	32 ± 24
Concluíram T2 (n:27)	40 ± 17	78 ± 22	41 ± 15	37 ± 19
p	0.430	0.008	0.037	0.464
α-tocoferol (μM)				
Concluíram T1 (n:21)	21.7 ± 6.7	29.8 ± 7.2	16.4 ± 6.1	13.4 ± 5.8
Concluíram T2 (n:27)	21.2 ± 6.9	31.1 ± 11.8	18.0 ± 4.3	13.3 ± 12.2
p	0.136	0.659	0.313	0.895
β-caroteno (μM)				
Concluíram T1 (n:21)	0.98 ± 0.95	1.48 ± 0.77	0.60 ± 0.48	0.89 ± 0.66
Concluíram T2 (n:27)	0.89 ± 0.76	1.91 ± 1.19	0.79 ± 0.51	1.12 ± 0.96
p	0.799	0.153	0.200	0.334

[#] Os dados são apresentados como Média ± Desvio Padrão, com o número de indivíduos entre parênteses (n). A significância das diferenças entre T1 e T2, para os três parâmetros estudados, nas diversas fases do estudo (antes da suplementação, depois da suplementação, placebo e diferenças vitamina-placebo) foi analisada pelo teste t para amostras independentes. A análise de significância das diferenças entre as 3 tomadas de amostra, em cada tratamento (T1 ou T2) foi realizada pela ANOVA, seguida do teste de Bonferroni. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

A tabela mostra, também, as médias da diferença entre as concentrações plasmáticas de vitC, αTC e βCT obtidas depois da suplementação (vitamina) e depois do período placebo, tanto para T1 quanto para T2. Podemos verificar que as médias das concentrações plasmáticas de vitC, αTC e βCT obtidas depois da suplementação são significativamente maiores do que as obtidas depois do placebo, para os tratamentos T1 e T2 [T1 (vitamina x placebo: 106% de aumento para a vitC, $p = 0,000$; 82% para αTC, $p = 0,000$ e 147% para o βCT, $p = 0,000$); T2 (placebo x vitamina: 90% de aumento para a vitC, $p = 0,000$; 74% para αTC, $p = 0,000$ e 142% para o βCT, $p = 0,000$)]. A análise da diferença das concentrações de vitaminas (entre vitamina e placebo) obtida entre T1 e T2 não

mostra nenhuma diferença estatisticamente significativa, ou seja, as concentrações plasmáticas aumentam com a suplementação não importando a ordem do tratamento, tanto para α TC como para o β CT. Foram observadas diferenças significativas nos níveis de vitC após a suplementação ($p=0,008$) e placebo ($p=0,037$) determinada pelo tratamento, T1 ou T2 (tabela 9).

4.7.3. Atividade das enzimas antioxidantes eritrocitárias antes e depois da suplementação

A tabela 10 mostra as médias das atividades específicas das enzimas (CuZn-SOD, CAT e GPx) obtidas dos grupos de idosos que concluíram o estudo T1($n=21$) e T2 ($n=27$) nas seguintes condições: antes da suplementação (basal) depois da suplementação (vitamina) e depois do placebo.

A tabela mostra, também, as médias da diferença entre a atividade das 3 enzimas depois da suplementação (vitamina) e depois do período placebo, tanto de T1 quanto de T2. Observamos que as médias das atividades enzimáticas da SOD, CAT e GPx obtidas depois da suplementação são significativamente menores do que as obtidas no placebo, para os tratamentos T1 e T2 [T1 (vitamina x placebo: - 5% para a SOD, $p=0,000$; -21% para CAT, $p= 0,000$ e -41% para GPx, $p= 0,000$); T2 (placebo x vitamina: -39% para a SOD, $p=0,000$; -40% para CAT, $p=0,000$ e -15% para GPx, $p= 0,000$)]. Os dados mostram que as atividades enzimáticas diminuem com a suplementação não importando a ordem do tratamento, sendo, no entanto, esta diminuição bastante discreta, no caso da SOD. A análise da diferença das atividades enzimáticas (entre vitamina e placebo) obtida entre T1 e T2 não mostra nenhuma diferença estatisticamente

Tabela 10 – Atividade específica das enzimas antioxidantes eritrocitárias antes e depois da suplementação*

Parâmetro	Antes Suplemen- tação	Depois Suplemen- tação (vitamina)	Placebo	Diferenças entre vitamina e placebo
SOD (U/mg Hb)				
Concluíram T1 (n:21)	6.2 ± 1.4	8.3 ± 3.0	7.9 ± 1.3	0.32 ± 2.8
Concluíram T2 (n:27)	5.3 ± 1.2	5.0 ± 1.3	8.2 ± 2.9	- 3.2 ± 3.0
p	0.080	0.000	0.631	0.000
Catalase (U/mg Hb)				
Concluíram T1 (n:21)	217 ± 72	166 ± 54	209 ± 47	- 43 ± 58
Concluíram T2 (n:27)	186 ± 57	101 ± 29	168 ± 36	-66 ± 41
p	0.161	0.000	0.001	0.107
GPx (U/g Hb)				
Concluíram T1 (n:21)	22.4 ± 8.8	12.3 ± 4.3	21.0 ± 5.5	-8.7 ± 6.0
Concluíram T2 (n:27)	18.8 ± 5.3	13.9 ± 2.6	16.3 ± 5.5	-2.5 ± 5.5
p	0.133	0.155	0.005	0.000

* Os dados são apresentados como Média ± Desvio Padrão, com o número de indivíduos entre parênteses (n). A significância das diferenças entre T1 e T2, para os três parâmetros estudados, nas diversas fases do estudo (antes da suplementação, depois da suplementação, placebo e diferenças vitamina-placebo) foi analisada pelo teste t para amostras independentes. A análise de significância das diferenças entre as 3 tomadas de amostra, em cada tratamento (T1 ou T2) foi realizada pela ANOVA, seguida do teste de Bonferroni. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

significativa para a CAT ($p=0,107$). Entretanto, observamos comportamento distinto nas atividades da SOD e GPx. No caso da SOD, a diminuição da atividade com a suplementação é maior em T2, possivelmente porque a atividade medida no final do período placebo é mais alta que a atividade basal. No caso da GPx, a diminuição da atividade é maior em T1 do que em T2 ($p=0,000$). Foram observadas diferenças significativas nas atividades, da SOD após a suplementação ($p=0,000$) da CAT após a suplementação ($p=0,000$) e da GPx após o período de placebo ($p=0,005$) determinadas pelo tratamento (T1 ou T2) conforme mostra tabela 10.

4.7.4. Concentrações plasmáticas das SRAT antes e depois da suplementação.

A tabela 11 mostra as médias das concentrações plasmáticas das SRAT obtidas dos grupos de idosos que concluíram o estudo T1(n=21) e T2 (n=27) nas seguintes condições: antes da suplementação (basal) depois da suplementação (vitamina) e depois do placebo.

Tabela 11 – Concentrações plasmáticas das SRAT e *burst* oxidativo de neutrófilos antes e depois da suplementação[#]

Parâmetro	Antes Suple- mentação	Depois Suple- mentação (vitamina)	Placebo	Diferenças entre vitamina e placebo
SRAT (nmol/mL plasma)				
Concluíram T1 (n:21)	2.88 ± 0.72	2.15 ± 0.53	3.41 ± 0.99	- 1.26 ± 0.91
Concluíram T2 (n:27)	2.71 ± 0.88	2.22 ± 0.58	3.41 ± 1.46	-1.18 ± 1.25
p	0.399	0.631	0.999	0.820
Burst oxidativo de PMN (mV / min)				
Concluíram T1 (n:21)	4.54 ± 2.38	1.67 ± 2.13	13.14 ± 13.13	- 11.7 ± 12.4
Concluíram T2 (n:27)	5.15 ± 6.93	2.77 ± 3.10	6.07 ± 6.93	- 3.3 ± 7.5
p	0.915	0.154	0.027	0.005
Burst oxidativo de PMN (mV x min)				
Concluíram T1 (n:21)	280 ± 166	154 ± 140	1217 ± 1813	-8.7 ± 6.0
Concluíram T2 (n:27)	312 ± 281	285 ± 377	733 ± 1162	-2.5 ± 5.5
p	0.387	0.137	0.295	0.000

[#] Os dados são apresentados como Média ± Desvio Padrão, com o número de indivíduos entre parênteses (n). A significância das diferenças entre T1 e T2, para os três parâmetros estudados, nas diversas fases do estudo (antes da suplementação, depois da suplementação, placebo e diferenças vitamina-placebo) foi analisada pelo teste t para amostras independentes. A análise de significância das diferenças entre as 3 tomadas de amostra, em cada tratamento (T1 ou T2) foi realizada pela ANOVA, seguida do teste de Bonferroni. O nível de significância estabelecido foi de p<0,05.

A tabela mostra, também, as médias da diferença entre as concentrações plasmáticas das SRAT obtidas depois da suplementação (vitamina) e depois do

período placebo, tanto para T1 quanto para T2. Podemos observar que as médias das concentrações plasmáticas de SRAT obtidas depois da suplementação são significativamente menores do que as obtidas no placebo, para os tratamentos T1 e T2 [T1 (vitamina x placebo: -37%, $p= 0,000$) ; T2 (placebo x vitamina: -35%, $p= 0,000$)]. A análise da diferença das concentrações das SRAT (entre vitamina e placebo) obtida entre T1 e T2, não mostra nenhuma diferença estatisticamente significativa, ou seja, as concentrações plasmáticas de SRAT diminuem com a suplementação, não importando a ordem do tratamento. Não foram observadas diferenças significativas das concentrações de SRAT nas 3 tomadas de amostra, em cada tratamento separado, T1 ou T2, conforme mostra a tabela 11.

4.7.5. *Burst* oxidativo de neutrófilos antes e depois da suplementação

4.7.5.1. Velocidade de produção de ERO/ERN medida por QL amplificada por luminol

O parâmetro utilizado para a avaliação do *burst* oxidativo foi a velocidade máxima de emissão de luz (mV/min) após estímulo com Zy. Os resultados, na tabela 11, estão expressos pela média da velocidade máxima de emissão de luz por PMN de idosos que concluíram o estudo T1 ($n=21$) e T2 ($n=27$) nas seguintes condições: antes da suplementação, depois da suplementação (vitamina) e depois do placebo. A tabela 11 mostra, também, as médias da diferença entre as médias das velocidades máximas de emissão de luz obtidas depois da suplementação (vitamina) e depois do período do placebo, tanto para T1 quanto para T2. Podemos verificar que os valores obtidos de velocidade máxima depois da suplementação são significativamente menores do que os obtidos após placebo, tanto para o tratamentos T1 (-87%, $p= 0,002$) como para T2 (-54%,

$p=0,000$). A análise da diferença das velocidades máximas de emissão de luz (entre vitamina e placebo) obtidas entre T1 e T2 mostra diferença estatisticamente significativa, ou seja, a velocidade de emissão de luz diminui com a suplementação, sendo entretanto, este decréscimo maior no tratamento T1. Foram observadas diferenças significativas na velocidade de emissão de luz após a suplementação placebo ($p= 0,027$) determinada pelo tratamento (T1 ou T2). Isto pode ser explicado pelo efeito rebote, ou seja, os PMN dos idosos de T1, após a suplementação placebo, apresentam valores de velocidade máxima de emissão de luz muito superior a seus valores basais.

4.7.5.2. Produção de ERO/ERN medida por QL amplificada por luminol

Ainda na tabela 11, podemos observar a atividade do *burst* oxidativo de neutrófilos (PMN) medida pela integral de emissão de luz, obtida do tempo zero até a emissão máxima de luz (mV x min). Os resultados estão expressos pelas médias das integrais de emissão de luz obtidas dos grupos de idosos que concluíram o estudo T1 ($n=21$) e T2 ($n=27$) nas seguintes condições: antes da suplementação, depois da suplementação (vitamina) e depois do placebo. A tabela mostra, também, as médias da diferença entre as integrais de emissão de luz obtidas depois da suplementação (vitamina) e depois do período placebo, tanto para T1 quanto para T2. Podemos verificar que as médias das integrais de emissão de luz obtidas depois da suplementação são significativamente menores do que as obtidas no placebo, para os tratamentos T1 (-87%, $p= 0,006$) e T2 (-61%, $p=0,003$). A análise da diferença das integrais de emissão de luz (entre vitamina e placebo) obtidas entre T1 e T2 mostra diferença estatisticamente

significativa, ou seja, a emissão de luz diminui com a suplementação, contudo a diminuição é maior no tratamento T1. Não foram observadas diferenças significativas nos valores da integral de emissão de luz entre as 3 tomadas de amostra em cada tratamento (T1 ou T2).

4.7.6. Inquérito nutricional: valores de ingestão diária de antioxidantes obtidos antes e após a suplementação

O inquérito nutricional foi aplicado em dois momentos do estudo, no início do estudo (antes da suplementação) e no final da fase 2 (depois da suplementação). As técnicas utilizadas para estas determinações estão citadas em materiais e métodos (3.3). Os valores de média que representam a ingestão diária de vitC, vitE, β CT e selênio, obtidos pelo inquérito nutricional, antes e depois da suplementação de T1 e T2, estão mostrados na tabela 12. Comparando-se os resultados das ingestões, antes e depois da suplementação vitamínica, não verificamos diferenças significativas nas ingestões de β CT, vitE e selênio, de T1 nem de T2. O valor da ingestão de vitC de T1, obtido depois da suplementação, é menor quando comparada ao valor obtido antes da suplementação ($p=0,029$). Estes resultados sugerem que o aumento das concentrações plasmáticas dos antioxidantes não está relacionado com as suas ingestões pela dieta, tão pouco com as diferenças encontradas nos parâmetros pró-oxidativos medidos.

Tabela 12 – Inquérito Nutricional: Valores de ingestão diária de antioxidantes da população idosa, obtidos antes e após a suplementação

Parâmetro	Antes da Suplementação	Depois da Suplementação	p
Vitamina C (mg/dia)			
Concluíram T1 (n=21)	259 ± 165	188 ± 137	0.029
Concluíram T2 (n=27)	249 ± 155	220 ± 193	0.424
Vitamina E (mg/dia)			
Concluíram T1 (n=21)	17,6 ± 19,1	15,5 ± 14,5	0.738
Concluíram T2 (n=27)	25,5 ± 15,1	18,0 ± 11,3	0.055
β-caroteno (mg/dia)			
Concluíram T1 (n=21)	5,40 ± 4,41	7,24 ± 6,94	0.105
Concluíram T2 (n=27)	6,35 ± 5,01	6,35 ± 5,32	0.995
Selênio (μg/dia)			
Concluíram T1 (n=21)	46,1 ± 62,4	32,7 ± 45,7	0.329
Concluíram T2 (n=27)	66,5 ± 80,0	47,4 ± 72,3	0.205

* Os dados foram apresentados como Média ± Desvio Padrão com o número de indivíduos entre parentêses (n). A análise de significância das diferenças entre as duas tomadas de amostras, em cada tratamento (T1 ou T2) foi realizada utilizando-se o teste t para amostras pareadas. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

5. Discussão

5.1. Avaliação do *status* oxidativo da população idosa

5.1.1. A população estudada

A população idosa selecionada para o estudo é oriunda do projeto EPIDOSO e mantém as mesmas características de seu coorte inicial (RAMOS *et al.*, 1998). Esta população é composta por 45 homens e 45 mulheres, apresentando idade média de 78,7 anos. Estas pessoas apresentam alterações fisiológicas decorrentes do processo de senescência, uma vez que isto é muito mais evidente após os 75 anos de idade. Deve-se ressaltar também que a prevalência de doenças degenerativas tais como, doenças cardiovasculares, câncer, disfunção cerebral, irregularidades no sistema imunológico, aumenta com a idade, o que pode acentuar a perda de reserva funcional orgânica presente nestes indivíduos (HUMMENT *et al.*, 1994; CHAIMOVICZ, 1997; GOODWIN *et al.*, 1999).

Os resultados do inquérito clínico realizado pelo geriatra nesta população, refletem dados de uma população relativamente saudável, pois é baixo o grau de dependência física para as atividades de vida diária e a função cognitiva esta, de modo geral, preservada (RAMOS *et al.*, 1998).

5.1.2. Inquérito nutricional

Vários estudos documentam a existência de deficiências nutricionais na população idosa. Fatores sociais, econômicos, fisiológicos e psicológicos, bem como condições adversas à saúde, podem influenciar os hábitos alimentares e a adequação da ingestão dietética em pessoas idosas (MUNRO, 1980; LUDMAN &

NEWMAN, 1986). O consumo adequado de vitaminas e minerais é importante para a manutenção das diversas funções metabólicas do organismo. Assim, a ingestão inadequada dessas substâncias pode potencialmente levar a estados de carência nutricional, com diversas manifestações patológicas conhecidas (MUNRO & DANFORD, 1989).

As RDA dos antioxidantes estudados, sugeridas pelo "*Food and Nutritional Board*" (1989) se baseiam em modelos para se evitar doenças carenciais específicas e correspondem a ingestão diária de 60 mg de vitC, 10 mg de vitE e 5,2 mg de β CT. Comparando-as com os resultados do inquérito nutricional realizado na população idosa, observamos que os nossos idosos possuem uma adequada ingestão diária de antioxidantes, através de sua alimentação. Interessante observar que as médias de ingestão alimentar de vitC, vitE e β CT nesta população são, estatisticamente significativas e superiores (41%, 112,4% e 119%, respectivamente) às médias de ingestão obtidas para o grupo jovem (40-49 anos).

Outro estudo realizado conjuntamente entre os Estados Unidos e Canadá e publicado pelo Instituto de Medicina (IOM) o "*Dietary Reference Intake*", sugere outras recomendações para vitC, 90mg/dia para homens e 75mg/dia para mulheres e 15mg/dia de α TC para ambos os sexos. Estas recomendações foram estabelecidas, tomando como base estudos que mostram a ação antioxidante destas vitaminas (McDERMOTT, 2000). Ainda assim, os resultados obtidos através de questionário de ingestão, aplicado ao presente grupo de idosos, são superiores a estas recomendações.

As médias de ingestão dos idosos participantes deste estudo também são superiores àquelas encontradas em outras populações, como a da população

adulta norte-americana onde os valores médios no sexo masculino e feminino são, respectivamente, 9,8 mg e 7,1 mg para vitE, 2,6 mg e 2,1 mg para carotenóides e 80 mg para ambos os sexos, para vitC (*National Center for Health Statistics*, 1987).

Os resultados do "*Second National Health and Nutrition Examination Survey*" (NHANES II) mostraram que a média de ingestão diária de vitE, em idosos, é de 8,3 mg para o sexo masculino e de 6,6 mg para o sexo feminino (MURPHY *et al.*, 1990). Em outro estudo realizado com idosos saudáveis na Finlândia, os valores de média de ingestão diária obtidos foram 78mg e 84mg de vitC; 1,76mg e 2,37mg de carotenóides, respectivamente, para homens e mulheres (KNEKT *et al.*, 1994). Na região de Boston, um estudo transversal avaliou 746 idosos considerados saudáveis relatando uma média de ingestão diária de vitC de 161mg entre os homens e 155mg entre as mulheres, acompanhada de ingestão diária de carotenóides de 3,1mg e 3,5mg para homens e mulheres, respectivamente (JACQUES *et al.*, 1995).

Os nossos achados são superiores aos mencionados nos trabalhos acima. Todos idosos estudados apresentam algum tipo de suporte para a manutenção de seus cuidados, não têm história de tabagismo nos últimos 5 anos e possuem acompanhamento médico, nutricional e com orientação de equipe gerontológica interdisciplinar há pelo menos 4 anos antes do início deste estudo, sendo esta a melhor explicação para justificar, médias superiores de ingestão de antioxidantes através da dieta aconselhada.

5.1.3. Inquérito laboratorial

5.1.3.1. Avaliação dos níveis plasmáticos de antioxidantes de baixo peso molecular

Apesar da ingestão diária das vitaminas antioxidantes dos idosos, ser superior à ingestão do grupo adulto jovem, as concentrações plasmáticas de vitC, α TC e β CT dos idosos, são significativamente menores (-36%, -31% e -32%, respectivamente) que as do grupo de adulto jovem. Este resultado pode ser explicado pelas diferenças de biodisponibilidade dos três antioxidantes, resultante de mudanças na absorção e distribuição tecidual, de acordo com o aumento da idade (MUNRO & DANFORD, 1989).

Um estudo de estresse oxidativo e envelhecimento comparou as concentrações plasmáticas de antioxidantes em população idosa saudável e portadores de incapacidades (dependentes) encontrando concentrações plasmáticas de α TC em torno de 34 μ M entre os idosos saudáveis, de 26 μ M para os idosos dependentes ($p < 0,05$) e 43 μ M para uma população de adultos jovens saudáveis ($p < 0,05$). Para o β CT, foram encontradas concentrações plasmáticas de 0,54 μ M entre os idosos saudáveis, 0,41 μ M entre os idosos dependentes e 0,55 μ M entre os adultos jovens saudáveis. Para a vitC, os achados foram 27,5 μ M, 21,4 μ M e 37,8 μ M, respectivamente. Este trabalho mostrou que as concentrações de α TC e vitC da população idosa (saudável e dependente) são inferiores às concentrações plasmáticas de grupos mais jovens (MEZZETTI *et al.*, 1996). Assim, nossos resultados são consistentes com a literatura. Quando comparamos a média das concentrações plasmáticas de α TC, obtida dos nossos idosos, com os dados de MEZZETTI *et al.* (1996) observamos que os nossos valores são inferiores, tanto a dos idosos saudáveis, como também, a dos idosos

dependentes. Entretanto, a concentração plasmática de vitC na nossa amostra, é superior àquela encontrada por MEZZETTI *et al.* (1996) mas é inferior à concentração (60 μM) de um grupo de idosos saudáveis com níveis de ingestão de vitC semelhante (VANDERJAGT *et al.*, 1987).

Já PAOLISSO *et al.* (1998) estudando a relação entre estresse oxidativo e idade, observou que as concentrações plasmáticas de vitC (59 μM) e de αTC (24 μM) entre idosos saudáveis (70-99 anos) são bastante próximas àquelas medidas nos idosos incluídos neste trabalho.

HESEKER & SCHNEIDER (1994) encontraram, em população de idosos, médias de ingestão diária destes antioxidantes inferiores às encontradas em nosso estudo. Entretanto, as concentrações plasmáticas, para homens e mulheres, foram respectivamente, de vitC 60,7 μM e 82,2 μM ; de αTC 34,5 μM e 36,3 μM e de βCT 0,55 μM e 0,83 μM , ou seja, superiores àquelas verificadas neste estudo, com exceção do βCT .

A revisão de vários trabalhos publicados, realizada por STOCKER & FREI (1991) mostra valores populacionais para as concentrações plasmáticas de vitC, αTC e βCT , sendo estas, respectivamente, de 30 a 150 μM , 15 a 40 μM e 0,3 a 0,6 μM . Outros autores relatam que, para a prevenção de doença cardiovascular e câncer, concentrações superiores a 30 μM de αTC em combinação com concentrações superiores à 50 μM de vitC e 0,4 μM de βCT , são desejadas (GEY, 1995).

Podemos observar que em idosos, nem sempre a ingestão alimentar diária de vitC, vitE e βCT obedece a aumentos correspondente nas concentrações plasmáticas dessas substâncias, principalmente, quando comparadas à populações mais jovens. Possivelmente, alterações na absorção, distribuição e

armazenamento dessas substâncias, durante o envelhecimento, são responsáveis pela perda de correlações entre a ingestão e os níveis séricos.

A defesa contra o dano provocado por ERO/ERN é realizada através da utilização de reservas antioxidantes celulares. Esta defesa é um processo complexo que envolve uma bateria de agentes protetores interrelacionados. A função primária dos antioxidantes é reduzir a velocidade de iniciação e/ou de propagação dos processos radicalares, suprimindo a geração de espécies reativas ou eliminando-as, diminuindo, ou até inibindo, o dano oxidativo a uma molécula alvo. Muitos trabalhos corroboram a proposta da participação de ERO/ERN no processo de envelhecimento (HOLMES *et al.*, 1992). Foi demonstrado que o declínio das alterações morfofuncionais dos tecidos, com a idade, poderia levar a uma produção aumentada de ERO/ERN sugerindo que o estresse oxidativo aumenta com a idade e que a utilização de antioxidantes deva ser maior, na tentativa de conferir proteção ao estresse oxidativo (REITER, 1995; MEZZETTI *et al.*, 1996). É provável, que esta seja a explicação para as baixas concentrações plasmáticas de antioxidantes de baixo peso molecular, encontradas neste estudo.

5.1.4. Correlação entre níveis plasmáticos e ingestão de antioxidantes de baixo peso molecular na população idosa

Considerando que a ingestão de antioxidantes da população idosa estudada se encontra dentro de valores adequados, passamos a verificar se as concentrações plasmáticas destes antioxidantes se relacionam com a sua ingestão. Podemos observar que nenhuma correlação significativa foi obtida entre a ingestão e níveis plasmáticos do α TC e β CT. No entanto, uma correlação

estatisticamente significativa e positiva, foi encontrada entre a ingestão de vitC e a sua concentração plasmática.

Durante a senescência, ocorrem alterações na composição corporal, como redução da massa muscular (sarcopenia) da massa óssea (osteopenia) e do conteúdo total de água corporal (por contração do volume intracelular). Os estoques de gordura tendem a aumentar com a idade, dificultando assim a biodisponibilidade de α TC e β CT e, conseqüentemente, influenciando na correlação entre ingesta e concentração plasmática. O mesmo não acontece com a vitC, que é hidrossolúvel.

Além disto, a análise nutricional não nos permite calcular a ingestão de α TC, fornecendo apenas a ingestão de vitE, que, como sabemos, é formada por vários isômeros de tocoferol.

Ainda devemos lembrar que a limitação da ingestão de alimentos, em quantidade e variedade, geralmente presente na população idosa, torna necessário um acompanhamento nutricional diferenciado para o idoso. Podemos também nos questionar, o que seria mais adequado para informar ao médico sobre a saúde do idoso, a ingestão ou os níveis plasmáticos destas vitaminas?

5.1.5. Atividade específica de enzimas eritrocitárias antioxidantes

CUTLER (1985) sugeriu que espécies de vida longa possuem mecanismos de proteção antioxidante melhores, em relação às velocidades de consumo de O_2 , do que espécies de vida curta. Por exemplo, as atividades da superóxido dismutase (SOD) em diferentes mamíferos se correlacionam com a taxa metabólica multiplicada pela expectativa máxima de vida da espécie. Portanto, a atividade da SOD em fígado humano, expressa em unidade de taxa metabólica, é

mais alta do que aquela para outras espécies de primatas e, muito mais alta, do que aquela de outros mamíferos. Isto não quer dizer que os níveis absolutos de antioxidantes sejam mais altos em tecidos humanos. A correlação é com a atividade antioxidante por unidade de taxa metabólica. Foi sugerido que uma mudança na regulação gênica tenha permitido síntese de moléculas de SOD, relativamente mais altas, contribuindo para a longevidade.

O equilíbrio entre a atividade das 3 principais enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx é de extrema importância para a remoção dos intermediários tóxicos dos sistemas biológicos.

Analisando nossos resultados, observamos que a atividade específica das enzimas CuZn-SOD, CAT e GPx, determinada no grupo de indivíduos idosos são significativamente maiores (20%, 27% e 30%, respectivamente) do que aquelas medidas em eritrócitos da população adulta, mais jovem, tabela 5. Estes resultados podem ser explicados como uma resposta adaptativa celular devido à diminuição da biodisponibilidade dos antioxidantes de baixo peso molecular (α TC, β CT e VitC). Esta diminuição nos níveis plasmáticos de α TC, β CT e VitC durante o envelhecimento também foi verificado por SHORT *et al.* (1997). Nossos resultados nos permitem sugerir que a senescência estaria associada a um declínio do sistema de defesa antioxidante molecular, com concomitante aumento do sistema de defesa enzimático, em resposta ao aumento paralelo na produção de ERO/ERN, o que também foi observado por MEZZETTI *et al.* (1996) e MECOCCHI *et al.* (2000).

A literatura, por sua vez, apresenta uma controvérsia apreciável sobre a atividade das enzimas antioxidantes no envelhecimento (SOHAL *et al.*, 1990; BENZI *et al.*, 1989). GUEMOURI *et al.* (1991) verificaram que a atividade da SOD

eritrocitária não se altera em indivíduos com menos de 65 anos de idade e é, discretamente menor, em indivíduos com idades superiores. Similarmente a atividade da GPx foi encontrada maior em adultos jovens (30-40 anos) estabilizando-se em adultos abaixo de 65 anos e, diminuindo em indivíduos com idade superior a 65 anos (ARTUR, *et al.*, 1992). Outro trabalho, mostrou ainda, que a atividade da CAT sofre as mesmas variações que as da SOD, mencionadas acima (SCHAEFER & THORLING, 1990).

TOKUNAGA *et al.* (1998) trabalhando com envelhecimento e estresse oxidativo, determinaram as concentrações plasmáticas de peróxidos de lipídio e a atividade das enzimas antioxidantes eritrocitárias (SOD, CAT e GPx) além de medirem a geração de $O_2^{\bullet-}$ por neutrófilos, entre indivíduos saudáveis, jovens e idosos. Este estudo verificou que a atividade da Cu/ZnSOD e da GPx é menor em idosos, comparativamente aos jovens e, a atividade da CAT, não se altera. Os níveis plasmáticos de peróxidos lipídicos são maiores nos idosos, quando comparados com os jovens. Eles relacionaram estes dados ao aumento do dano, medido pelos níveis de peróxidos lipídicos, verificado no processo de envelhecimento, devido ao aumento na geração de ERO/ERN, determinado por um aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ por neutrófilos e, diminuição na capacidade do sistema enzimático antioxidantes.

Um estudo sobre o envelhecimento, utilizando fibroblastos epiteliais, isoladas de indivíduos com idades entre 20 e 80 anos, determinou a proporção de deleção no mtDNA, pelos níveis de 8-oxo-deoxi-guanosina (8OHdG); determinou, também, os níveis de malonildialdeído (MDA) e a atividade das enzimas CuZnSOD, Mn-SOD, CAT e GPx. Foi verificado um aumento de 8OHdG e MDA, com a idade, acompanhada de decréscimo na atividade das enzimas com a

idade, com exceção da Mn-SOD que mostrou aumento de atividade até aos 60 anos e, depois dos 60, diminui. Eles sugeriram que, depois dos 60 anos, as funções antioxidantes declinam e que o aumento do dano ao DNA estaria associado ao processo de envelhecimento (LU *et al.*, 1999).

PANSARASA *et al.*(1999) trabalhando com miócitos retirados de indivíduos com idades entre 17 e 91 anos, determinaram os níveis de oxidação lipídica e, de proteínas e a atividade das enzimas CAT, GPx ,Cu/Zn-SOD e Mn-SOD. Verificaram aumento significativo dos níveis de peróxidos lipídicos e carbonilas. Quanto a atividade das enzimas, foram obtidos os seguintes resultados: GPx e CAT não se alteram em função da idade, Cu/Zn-SOD diminui com a idade e a Mn-SOD aumenta após os 75 anos. Devemos lembrar que a enzima Mn-SOD é mitocondrial, reforçando a teoria mitocondrial de envelhecimento (BOVERIS & COSTA, 1999)

Por outro lado, alguns trabalhos relatam aumento de atividade das enzimas (SOD, CAT e GPx) em função da idade. Uma vez que os níveis de antioxidantes moleculares são menores durante o envelhecimento, acredita-se que o sistema de defesa não enzimático apresente papel mais importante de proteção à condição de estresse oxidativo (WARNER,1994; ZIMA *et al.*, 1995; MEZZETTI *et al.*, 1996)

VANELLA *et al.* (1989) sugeriu que o processo de envelhecimento poderia alterar cada enzima de maneira diferente. Este estudo propõe a existência de mecanismos responsáveis pela regulação da atividade das enzimas, nos tecidos em senescência, os quais conferem proteção contra a atividade das ERO/ERN, que devem ser gerados em maiores proporções durante o envelhecimento (SAWADA & CARLSON, 1987; SOHAL *et al.*, 1990; SOHAL,1991).

5.1.6. Níveis plasmáticos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Como consequência da diminuição na disponibilidade de antioxidantes moleculares para conter a ação oxidativa de ERO/ERN sobre macromoléculas, os produtos de oxidação lipídica (SRAT) no plasma dos indivíduos idosos são significativamente maiores (34%) que nos jovens. Inúmeros trabalhos relatam aumento dos produtos de oxidação lipídica, quando a defesa antioxidante está diminuída (PAOLISSO *et al.*, 1998; TOLONEN *et al.*, 1988; PANSARASA *et al.*, 1999; LU *et al.*, 1999; TOKUNAGA *et al.*, 1998).

Apesar de baixos níveis plasmáticos de antioxidantes (vitC, α TC e β CT) e altas concentrações de SRAT encontrados nos nossos idosos, em relação aos jovens, nenhuma correlação significativa foi encontrada entre estes parâmetros na população idosa (vitC x LPO: $p=0,929$; α TC x LPO: $p=0,841$ e β CT x LPO: $p=0,726$).

5.1.7. Correlação entre níveis plasmáticos de antioxidantes e atividades do *burst* oxidativo de neutrófilos sangüíneos da população idosa

A avaliação da atividade de PMN, isolados de indivíduos jovens não pode ser comparada com a atividade de PMN dos nossos idosos, uma vez que os ensaios foram realizados com estímulos diferentes (acetato de forbol miristato, PMA, para a população jovem e Zy no presente estudo). Os resultados do presente estudo mostram haver uma correlação positiva entre os parâmetros de

avaliação do *burst* oxidativo de neutrófilo (velocidade de produção de ERO/ERN e a produção de ERO/ERN) com os níveis plasmáticos de vitC (vitC x velocidade: $p=0,010$; vitC x integral: $p=0,000$), não havendo correlação significativa em relação aos outros antioxidantes estudados.

Sabemos que os PMN contém 100 vezes mais vitC que o plasma; além disso, estas células captam vitC oxidada, dehidroascorbato, e regeneram o ácido ascórbico à sua forma reduzida, devolvendo parte do mesmo para o plasma. Altos níveis de vitC em PMN poderia representar uma defesa adicional contra ERO/ERN produzidas durante o *burst* oxidativo (LEVINE *et al.*, 1995).

De acordo com CHAN *et al.* (1998) a atividade de PMN, estimulados com PMA e medida pelo *burst* oxidativo, aumenta com a idade. Uma possível explicação de *burst* oxidativo mais ativo em PMN, isolados de indivíduos idosos, seria a presença aumentada de produtos de oxidação de lipídios no plasma destes indivíduos (PAOLISSO *et al.*, 1998; TOLONEN *et al.*, 1988; PANSARASA *et al.*, 1999; LU *et al.*, 1999; TOKUNAGA *et al.*, 1998) que poderiam ativar a NADPH oxidase. Ou seja, os lipoperóxidos, produzidos pela oxidação de lipídios de membrana, poderiam acionar alguma outra via de estimulação dos PMN, por exemplo, a do metabolismo do ácido araquidônico, catalisada pela fosfolipase A_2 , cujos produtos ativariam o sistema NADPH oxidase (KUIJK *et al.*, 1987). Uma das consequências da produção de ERO/ERN por PMN é o aumento de Ca^{2+} livre intracelular, acreditando-se que este aumento seja um fator importante na ativação da fosfolipase A_2 , resultando na geração de produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico. Uma vez liberado, o ácido araquidônico será metabolizado por duas vias enzimáticas principais: a via da ciclooxigenase e a via da lipoxigenase (ERNSTER, 1988). A via da ciclooxigenase produz as

prostaglandinas e tromboxano A_2 , agente quimiotático e ativador de PMN (WELBOURN *et al.*, 1991); a via da lipoxigenase leva a geração dos leucotrienos, sendo o LTB₄ potente estimulador de várias funções de neutrófilos, entre elas a geração de $O_2^{\bullet-}$ (FORD-HUTCHINSON *et al.*, 1980).

Por outro lado, outros estudos, utilizando estímulos fagocíticos e quimiotáticos (fMLP) mostraram decréscimo na atividade NADPH oxidase de PMN estimulados, com o aumento da idade (FÜLÖP *et al.*, 1988; McCAFFERTY *et al.*, 1995). De acordo com FÜLÖP *et al.* (1989) esta deficiência poderia ser consequência de alterações na proteína G ligadora de GTP, impedindo a liberação de segundos mensageiros a partir da quebra de fosfatidilinositol, impossibilitando a ativação da NAPH oxidase.

Comparando nossos dados com a literatura, podemos sugerir que, os PMN isolados dos idosos, são capazes de uma maior atividade, medida por um *burst* oxidativo mais intenso, provavelmente devido a maior proteção proporcionada por maiores concentrações de vitC encontradas nos mesmos.

5.2. Avaliação de suplementação vitamínica na população idosa

5.2.1. Níveis plasmáticos de antioxidantes de baixo peso molecular: efeito da suplementação

Mudanças, que podem ocorrer com a idade, aumentando as taxas de pró-oxidantes ou diminuindo os mecanismos de defesa antioxidante, podem ser a explicação para muitas das alterações orgânicas que se observam ocorrem com o envelhecimento, em processos degenerativos como a Doença de Parkinson, como o mal de Alzheimer e outros (MECOCCI *et al.*, 1994; BUSCIGLIO *et al.*, 1995; MIRANDA *et al.*, 2000; SOUZA-PINTO *et al.*, 1999).

A interação das ERO/ERN com as bases do DNA pode promover câncer, mutações ou contribuir para o envelhecimento, podendo inclusive, causar dano a sítios regulatórios de genes e levar à morte celular (AMES *et al.*, 1993; MENEHINI, 1988; AMES & GOLD, 1991; CUTLER, 1991; ASHOK & ALI, 1998). A integridade do DNA tem relação com o envelhecimento, apesar do dano nele encontrado não poder ser, unicamente, responsável por todas as mudanças que ocorrem no envelhecimento (ASHOK & ALI, 1999).

Há uma relação entre a peroxidação de lipídios e o processo do envelhecimento evidenciada pelo acúmulo, com a idade, de pigmentos fluorescentes gerados, pelo menos em parte, pela ligação de proteínas a produtos de lipoperoxidação (BRUNK *et al.*, 1992).

Apesar da ação específica de enzimas que hidrolisam proteínas oxidadas, estas, acumulam-se com a idade (OLIVER *et al.*, 1987; STADTMAN, 1992; KLAUNING *et al.*, 1998; STADTMAN & BERLETT, 1998). Em duas patologias humanas relacionadas com o envelhecimento precoce, a Síndrome de Werner e a progeria, o nível de proteína oxidada, determinado em cultura de fibroblastos isolados de pacientes portadores destas patologias, se encontra muito mais alto quando comparado a indivíduos normais e/ou idosos normais (STADTMAN, 1992) sugerindo uma inter-relação entre o processo de envelhecimento e o acúmulo de proteínas, oxidativamente modificadas.

Estas e outras observações das possíveis implicações do dano oxidativo no processo de envelhecimento, tem levado ao estudo dos mecanismos de defesa antioxidante.

Observando os nossos dados, os níveis plasmáticos de antioxidantes dos idosos aumentam significativamente com a suplementação não importando a

ordem de tratamento. Os aumentos observados nos idosos que receberam o tratamento T1 (vitamina e placebo) são para vitC 106%, α TC 82% e β CT 147%; para os que receberam tratamento T2 (placebo e vitamina) são vitC 90%, α TC 74% e β CT 142%. As únicas diferenças significativas observadas são nas concentrações de vitC determinadas nos tratamentos T1 e T2, depois da suplementação (T1=62 μ M e T2=78 μ M) e após com placebo (T1=30 μ M e T2=41 μ M). Esta observação pode ser resultado de diferenças individuais entre os idosos, uma vez que a concentração de vitC basal (antes da suplementação) e a concentração de vitC do placebo são muito próximas tanto para o tratamento T1, quanto para o T2 (basal: T1=34 μ M, placebo T1=30 μ M; basal: T2=40 μ M, placebo T2=41 μ M).

Nossos resultados estão de acordo com trabalhos de suplementação, onde foram verificados aumentos de antioxidantes plasmáticos após períodos de suplementação (SIMONS *et al.*, 1999).

Um trabalho sobre prevenção de doença cardiovascular e câncer sugeriu que a concentração plasmática de α TC ideal deveria ser superior a 30 μ M, em combinação à concentração plasmática de vitC superior à 50 μ M e a de β CT superior a 0,4 μ M (GEY, 1995). STOCKER & FREI (1991) relataram que, para a ação antioxidante, as concentrações plasmáticas desejadas de vitC, α TC e β CT, devem estar entre os valores de 30-150 μ M; 15 a 40 μ M e 0,3 a 0,6 μ M, respectivamente. Sendo assim, a suplementação deste trabalho atende às recomendações sugeridas pelos autores citados acima.

Em 1996, SNOWDON *et al.* publicaram um estudo relacionando concentração plasmática de antioxidantes, carotenóides e α TC, com a capacidade funcional reduzida de idosos. Neste trabalho os autores descreveram

uma direta relação entre a dependência para auto cuidado e a concentração plasmática de licopeno.

Algumas evidências experimentais indicam que um baixo *status* antioxidante pode ter um papel importante na etiologia da neurodegeneração e isquemia cerebral, as causas mais comuns de declínio cognitivo em pessoas idosas. Então, os antioxidantes, talvez, possam reduzir o dano oxidativo (formação e agregação de proteína β A4 amilóide) encontrado nos pacientes com doença de Alzheimer e síndrome de Down (DYRKS *et al.*, 1992).

Estudo epidemiológico realizado com japoneses americanos suplementados com α TC durante 4 anos, demonstrou que a suplementação está associada a um baixo risco de déficit cognitivo (PERRIG *et al.*, 1997).

Os resultados do "*Third National Health and Nutrition Examination Survey*" demonstraram, também, que a diminuição dos níveis de α TC/colesterol, está associada a níveis aumentados de redução de memória (PERKINS *et al.*, 1999).

Baseados nestes e outros estudos, podemos dizer que, o aumento do *status* de estresse oxidativo parece ser comum durante o processo de envelhecimento e o *status* antioxidante pode influenciar, significativamente, o dano oxidativo associado com a idade. Sabemos que as alterações produzidas na molécula de DNA (AMES *et al.*, 1993) nos pigmentos fluorescentes gerados pela ligação de proteínas a produtos de lipoperoxidação (BRUNK *et al.*, 1992) e proteínas modificadas oxidativamente, são exemplo de danos relacionados com o processo de envelhecimento.

No entanto, existem trabalhos de suplementação antioxidante que não associam a mesma diminuição do risco para doenças, ou qualquer tipo de efeito benéfico para o indivíduo. O maior estudo controlado de suplementação de β CT

em uma população ocidental - Estudo de Prevenção de câncer com α TC e β CT (ATBC) na Finlândia - não confirmou o efeito protetor do β CT contra câncer de pulmão (HEINONEN *et al.*, 1994). Os resultados do CARET (Estudo de eficácia do retinol e β CT) (OMENN *et al.*, 1996) e do "*Physicians Health Study*" (HENNEKENS *et al.*, 1996) os quais diferem em alguns detalhes crucialmente importantes, refletindo diferenças nas características das populações de estudo (história de tabagismo e exposição a asbestos nos indivíduos do estudo CARET) ou em regimes de dosagens e tratamento dos suplementos de β CT, também falharam em confirmar a hipótese de um efeito benéfico. O "*Physicians Health Study*" (HENNEKENS *et al.*, 1996) iniciado em 1982, envolveu 22.071 médicos, do sexo masculino, com idades entre 40 e 84 anos, que foram aleatoriamente designados a receber aspirina (325 mg em dias alternados) β CT (50mg em dias alternados) ou ambas as substâncias, ou placebo. Onze por cento dos indivíduos eram fumantes no início do estudo e 39% eram ex-fumantes, A suplementação aumentou os níveis plasmáticos de β CT em quatro vezes (de 0,3 a 1,2 mg/L). Após 12 anos de tratamento, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos placebo e β CT, na incidência de todos os cânceres, incidência de câncer de pulmão e óbitos por doenças cardiovasculares (HENNEKENS *et al.*, 1996). Os participantes do estudo CARET receberam 30 mg/dia de β CT, 25.000UI de retinol, ou placebo, durante 4 anos em média. As concentrações séricas médias de β CT aumentaram de 170 para 2100 ng/mL, no grupo tratado. Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos β CT/vitamina A e placebo quanto a riscos de cânceres (OMENN *et al.*, 1996). Vale comentar, que estes estudos, foram conduzidos entre indivíduos com um histórico de fumo intenso (ou exposição a asbestos) e que possuíam, portanto, na

admissão aos estudos, alto risco de desenvolver câncer de pulmão. A natureza do processo de carcinogênese é tal que, para muitos destes indivíduos, poder-se-ia esperar que apresentassem lesões pré-cancerosas que não puderam ser detectadas na admissão. Pode ser, que o alto nível de ingestão de β CT e/ou retinol possa ter causado a progressão destas lesões.

Finalizando ainda esta discussão, devemos lembrar dos resultados obtidos pelo inquérito nutricional, avaliados antes e após o período de suplementação (vitamina e placebo). Comparando-se os resultados das ingestões, antes e depois da suplementação vitamínica, não verificamos diferenças significativas nas ingestões de β CT, vitE e selênio, de T1 nem de T2. O valor da ingestão de vitC de T1 obtido depois da suplementação, é menor quando comparado ao valor, desta substância, obtido antes da suplementação. Talvez, os idosos tenham ingerido quantidades menores de alimentos, fontes de vitC, possivelmente, pelo fato, de estarem recebendo a suplementação vitamínico-mineral. De qualquer forma, estes resultados sugerem que o aumento das concentrações plasmáticas dos antioxidantes não está relacionado com as suas ingestões pela dieta, tão pouco com as diferenças encontradas nos parâmetros pró-oxidativos medidos.

5.2.2. Atividade das enzimas antioxidantes eritrocitárias: efeito da suplementação

Como já foi discutido anteriormente, não existe um consenso em relação as atividades das enzimas antioxidantes durante o envelhecimento, muito embora os estudos, geralmente, analisam os sistemas antioxidantes separadamente, isto é, ou avaliam só o sistema enzimático antioxidante versus algum parâmetro oxidativo, ou então, só avaliam o sistema antioxidante molecular. Acreditando na

cooperação *in vivo* do sistema de defesa antioxidante, este trabalho avalia a ação conjunta dos antioxidantes. Sendo assim, poderíamos explicar nossos resultados da seguinte forma: uma vez que as concentrações plasmáticas dos antioxidantes de baixo peso molecular se encontram em concentrações adequadas, a atividade do sistema antioxidante enzimático poderia diminuir. Possivelmente, na tentativa de alcançar o equilíbrio.

A suplementação antioxidante leva a uma diminuição significativa da atividade de todas as enzimas eritrocitárias estudadas (Cu/Zn-SOD, CAT e GPx) não importando o tratamento T1 ou T2, com exceção da SOD onde a diminuição é mais discreta. Passaremos assim, a analisar as enzimas separadamente.

No caso da CAT, como já dissemos, sua atividade diminuiu significativamente com a suplementação e, esta diminuição não é diferente entre os tratamentos, T1 ou T2. No entanto, uma significativa diferença na atividade da enzima foi observada quando T1 e T2 foram comparadas, depois da suplementação (vitamina) e depois da suplementação placebo. Isto pode ser explicado por diferenças individuais dentro de cada grupo de tratamento.

Analisando os resultados da GPx, podemos observar uma diminuição da atividade mais acentuada em T1 do que T2 ($p=0,000$). Esse efeito pode ser explicado pelo efeito rebote observado nos idosos participantes de T1, ou seja, quando o paciente troca da suplementação antioxidante para a suplementação placebo, a atividade da GPx retorna para níveis similares aos do período basal (antes da suplementação) indicando possivelmente que, o *status* de antioxidantes moleculares poderiam modular a expressão desta enzima.

Quanto a atividade da SOD, notamos que a diminuição da atividade com a suplementação é muito mais efetiva no grupo de tratamento T2, possivelmente

porque a atividade da SOD obtida depois da suplementação placebo é maior do que a atividade basal.

Por outro lado, devemos enfatizar que algumas variações individuais podem ocorrer nos grupos de tratamento, resultando em algumas diferenças observadas concernentes a atividade das enzimas, depois das suplementações vitamina e placebo.

Comparando nossos achados com a literatura, um estudo conduzido em instituições para o idosos, na região central da França, duplo-cego, randomizado e controlado por placebo, demonstrou que a suplementação com vitaminas e outros oligoelementos, em modestas quantidades, melhora a atividade das enzimas eritrocitárias, SOD e GPx (MONGET *et al.*, 1996).

Considerando a proposta de VANELLA *et al.* (1989) sobre a existência de mecanismos responsáveis pela regulação da atividade das enzimas, nos tecidos em senescência, podemos sugerir que, este mecanismo esteja direta ou indiretamente, relacionado com altas concentrações de antioxidantes, modulando assim a expressão das enzimas.

5.2.3. Concentrações plasmáticas de SRAT antes e depois da suplementação

Apesar das críticas referentes a este método, ele é útil quando usado conjuntamente com outras medidas na avaliação do *status* oxidativo. Embora a relação entre peroxidação lipídica e envelhecimento tenha sido exaustivamente investigada, os estudos têm apresentado resultados conflitantes. O aumento da peroxidação lipídica e a diminuição da proteção antioxidante ocorre com frequência, mas não são fatores exclusivos do envelhecimento. As variações dos

valores de peroxidação lipídica encontrado na literatura, podem estar relacionadas não apenas com a idade, mas também com fatores como espécie, sexo e tecido específico (RIKANS & HORNBROOK, 1997).

Podemos sugerir que níveis elevados de produtos de oxidação lipídica observado nos idosos, antes da suplementação, poderiam ser responsáveis pelo *burst* oxidativo dos neutrófilos mais intenso, conforme mostram nossos dados. Ou seja, os lipoperóxidos, produzidos pela oxidação de lipídios de membrana, poderiam acionar alguma outra via de estimulação dos PMN, por exemplo, a do metabolismo do ácido araquidônico, catalisada pela fosfolipase A₂, cujos produtos ativariam o sistema NADPH oxidase (KUIJK *et al.*, 1987) produzindo mais ERO/ERN que, por sua vez, poderiam atacar mais lipídios das membranas celulares (YAGI, 1982; LU *et al.*, 1999). Também observamos que os níveis de antioxidantes plasmáticos de baixo peso molecular eram inadequados, antes da suplementação. Assim, as macromoléculas poderiam estar mais susceptíveis aos danos oxidativos, no caso a oxidação de lipídios.

Os níveis de produtos da oxidação de lipídios determinado pelas SRAT diminuem com a suplementação, não importando a ordem do tratamento. Podemos observar uma diminuição de 37% nas SRAT, determinadas nos indivíduos que receberam o tratamento T1 e uma diminuição, de 35% nas SRAT, determinada nos indivíduos de T2. Inúmeros trabalhos relacionam o aumento de produtos da oxidação de lipídios com estresse oxidativo (YAGI, 1993; GIUGLIANO *et al.*, 1996; MEZZETTI *et al.*, 1996; PAOLISSO *et al.*, 1998; PANSARASA *et al.*, 1999; TOKUNAGA *et al.*, 1998). Na realidade, podemos interpretar o aumento de LPO, semelhante aos descritos em outros trabalhos, como um dos indicadores de envelhecimento, uma vez que, com a idade, a

peroxidação lipídica aumenta e o sistema de defesa antioxidante declina (MECOCCI *et al.*, 2000).

Estudos envolvendo idosos suplementados com α TC, vitC e selênio demonstraram decréscimos nos níveis plasmáticos de SRAT (WARTANOWICZ *et al.*, 1984; TOLONEN *et al.*, 1988).

5.2.4. BURST oxidativo de neutrófilos: efeitos da suplementação

A quimioluminescência (QL) amplificada por luminol tem sido utilizada para a detecção da resposta oxidativa dos neutrófilos (DECHALET *et al.*, 1982). A luz medida resulta da excitação do luminol, devido a sua reação com oxidantes. A literatura tem reafirmado que o principal oxidante produzido pelos neutrófilos ativados, responsável pela reação com o luminol é o ácido hipocloroso, resultante da reação do H_2O_2 com Cl^- , catalisada pela mieloperoxidase (BRETEL, 1985). Sabemos também que a atividade da mieloperoxidase pode ser modulada por $\text{O}_2^{\bullet-}$, provocando um aumento na produção, por exemplo, de $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , responsáveis por um aumento no *burst* oxidativo de neutrófilos, medido por QL amplificada por luminol (KETTLE & WINTERBOURN, 1997).

Recentemente, foi demonstrado que o peroxinitrito (ONOO^-) um produto da reação do $\text{NO}^\bullet$ com o $\text{O}_2^{\bullet-}$, também contribui para a produção de luz medida na presença de luminol, num sistema acelular. Neste sistema foi mostrado que nem o $\text{NO}^\bullet$ e nem o $\text{O}_2^{\bullet-}$, sozinhos, foram capazes de induzir uma QL significativa (RADI *et al.*, 1993).

A avaliação do *burst* oxidativo de neutrófilos isolados dos idosos, expressa por velocidade e produção total de ERO/ERN, demonstra que a suplementação antioxidante diminui, com significância, estes parâmetros analisados. Também

podemos observar o efeito rebote nos idosos de T1, ou seja, nos idosos que receberam primeiro a suplementação de antioxidantes e depois, a suplementação placebo. O *burst* oxidativo diminui com a suplementação e depois aumenta muito mais, em relação ao basal, depois do período da suplementação placebo. Este efeito é explicado pela diminuição da biodisponibilidade dos antioxidantes plasmáticos. Podemos notar este efeito tanto para os valores de integral de emissão de luz, quanto para os valores da velocidade de emissão de luz.

Estudos com neutrófilos humanos mostraram que a QL amplificada por luminol, estimuladas por Zy, resulta na ativação de vias de ativação da NADPH oxidase, além daquela dependente da PKC. O Zy age ligando-se a receptores de membrana e estimula as vias dependentes de proteínas G, resultando na ativação de tirosina quinases e, conseqüentemente, da cascata das MAP quinases, resultando na fosforilação de $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$, componentes citosólicos da NADPH oxidase, que fosforilados migram para a membrana para se acoplarem aos componentes de membrana desta enzima, ativando-a (EL BENNA *et al.*, 1997). O Zy, causa uma perturbação na estrutura da membrana resultando na quebra de fosfolipídios pela fosfolipase A_2 , ativando o metabolismo do ácido araquidônico com formação de oxidantes. Assim, a via da ciclooxigenase produz as prostaglandinas e o tromboxano A_2 , agente quimiotático e ativador de PMN (WELBOURN *et al.*, 1991) e a via da lipoxigenase os leucotrienos, sendo o LTB₄ potente estimulador de várias funções de neutrófilos, entre elas a geração de $O_2^{\bullet-}$ (FORD-HUTCHINSON *et al.*, 1980; MARIDONEAU-PARINI & TAUBER, 1986; CHEUNG *et al.*, 1983).

Os resultados de CHAN *et al.* (2001) sobre QL amplificada por luminol, mostraram que a saturação das membranas de neutrófilos com α TC, causa uma

inibição significativa do *burst* oxidativo destas células estimuladas, com ambos os estímulos utilizados, PMA e Zy. Entretanto, esta inibição é mais acentuada com o PMA. Estes resultados, sugerem que o α TC age preferencialmente nas vias de sinalização dependentes de PKC. A inibição da via de ativação da PKC pelo α TC pode ocorrer através da ativação de serina/treonina fosfatases as quais, desfosforilariam a PKC, desativando-a (RICCIARELLI & AZZI, 1998). A ativação da NADPH oxidase de neutrófilos, resultando na produção de ERO/ERN por estas células, depende do acoplamento dos componentes citosólicos aos componentes de membrana da enzima (BABIOR, 1978; BABIOR, 1999). A proteína p47^{phox} é um dos componentes citosólicos da NADPH oxidase que, para migrar para a membrana, precisa ser fosforilada pela PKC (YAMAGUSHI *et al.*, 1995). Portanto, a PKC desativada fica impedida de fosforilar a proteína p47^{phox} e esta, por sua vez, não migrará para a membrana e a NADPH oxidase não será ativada. Com isso o *burst* oxidativo de neutrófilos ficará comprometido.

Tem sido demonstrado que estímulos, que agem via receptor, podem ativar o *burst* oxidativo de neutrófilos através de vias que dependem da ação de tirosina quinase, pois estas podem também ativar a NADPH oxidase (KUSUNOKI *et al.*, 1992). CHAN *et al.* (2001) demonstraram que o α TC modula a ativação da NADPH oxidase também, pela ativação de tirosinas fosfatases. Estes trabalhos explicam a diminuição da atividade do *burst* oxidativo de neutrófilos, medida por QL amplificada por luminol, observada nos idosos suplementados.

Os dados obtidos neste estudo indicam, que o processo de envelhecimento apresenta um componente de estresse oxidativo, que é modulado pelo aumento, através da suplementação e não pela dieta, da biodisponibilidade de antioxidantes moleculares. Como verificamos, somente o monitoramento clínico e o

aconselhamento nutricional, não são suficientes, neste caso, para garantir o envelhecimento saudável.

A administração de antioxidantes poderia minimizar o dano oxidativo orgânico sofrido ao longo da vida e assim, melhorar a qualidade de vida do ser humano. Espera-se que num futuro bastante próximo, possamos chegar a um consenso sobre o real valor do emprego de antioxidantes, definindo combinações apropriadas, parâmetros nutricionais, laboratoriais e clínicos que, em conjunto possam mostrar o papel benéfico da suplementação antioxidante sobre a longevidade saudável.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

- 1) Os parâmetros oxidativos estimados na população idosa são mais altos que os correspondentes medidos na população adulta, mais jovem. Este fato é acompanhado de menor disponibilidade de antioxidantes na mesma população idosa.
- 2) Apesar da adequada ingestão diária de vitaminas antioxidantes pela dieta alimentar, observada na população idosa, as concentrações plasmáticas dos mesmos não se correlacionam com a sua ingestão, indicando que a absorção, distribuição, armazenamento e, possivelmente, um maior gasto dos mesmos, são fatores responsáveis pela menor proteção antioxidante encontrada.
- 3) Os níveis plasmáticos de antioxidantes são aumentados após a suplementação, qualquer que seja a ordem de ingestão, (vitamina ou placebo). Em resposta ao aumento, observou-se uma regulação negativa na atividade das enzimas antioxidantes e nos parâmetros oxidantes: diminuição da atividade do *burst* oxidativo de neutrófilos e dos níveis de produtos derivados da oxidação de lipídios.
- 4) O efeito importante, atribuído ao aumento da concentração sistêmica e, possivelmente celular, dos antioxidantes, descrito no item anterior, desaparece quando os antioxidantes são substituídos por placebo, com manifestação de claro efeito rebote dos parâmetros oxidantes, que voltam a aumentar nestas condições (tratamento T1).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências bibliográficas

- ADAMS, J. M. and CORY, S. – The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. **Science**, v. **281**, p. 1322, 1998.
- AIKENS, J.; DIX, J. A. – Perhydroxyl radical (HOO·) initiated lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.**, **226**: 15091-15098, 1991.
- ALLEN, R. C. – Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence; a kinetic approach to analysis. In: De LUCA, M.A.; McELROY, W. D. eds. **Methods in Enzymology**. San Diego, Academic Press, 133: 449-93, 1986.
- ALLEN, R. C.; STJERNHOLM, R. I.; STEELE, R. H. - Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **47**: 679-84, 1972.
- AMES, B. N.; CATHCART, R.; SCHWIERS, E. & HOCHSTEIN, P. – Uric acid provides antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **78**, 6858-6862, 1981.
- AMES, B. N. – Dietary carcinogens and anticarcinogens – oxygen radicals and degenerative disease. **Science** **221**, 1983.
- AMES, B. N. – Mutagenesis and carcinogenesis: Endogenous and exogenous factors. **Environ. Mol. Mutagen.** **14**, 66-77, 1989.
- AMES, B. N. – Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer. **Free Radic. Res. Commun.** **7**: 121-128, 1989.

- AMES, B. N.; GOLD, L. S. – Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. **Mutation Research** **250**: 3-16, 1991.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. – Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **90**: 7915-7922, 1993.
- ARITA, M.; SATO, Y.; MIYATA, A.; TANABE, T.; TAKAHASHI, E.; KAYDEN, H. J.; ARAI, H.; INOUE, K. – Human α -tocopherol transfer protein: cDNA cloning, expression and chromosomal localization. **Biochem.** **306**: 437-443, 1995.
- ARTUR, Y.; HERBETH, B.; GUEMOURI, L.; LECONTE, E.; JEANDEL, C. & SIEST, G. - Age-related variations of enzymatic defences against free radicals and peroxides. In: I. Emerit, B. Chance Eds., **Free Radicals and Aging**. p. 359-367, 1992.
- ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; GAJEWSKI, E.; DIZDAROGLU, M. – Copper-iron dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. **Biochem. J.** **273**: 2601-2604, 1991.
- ASADA, K.; KANEMATSU, S.; OKAKA, S. & HAYAKAWA, T. – Phylogenetic distribution of three types of superoxide dismutases in organisms and in cell organelles. In: Bannister, J. V. & Hill, H. A. O. (Eds). **Chemical and biochemical aspects of superoxide and superoxide dismutase**. Elsevier/North Holland, NY, 1980.
- ASHKENAZI, A. and DIXIT, V.M. – Death receptors: Signaling and Modulation. **Science** **v.281**, p. 1305, 1998.
- ASHOK, B. T. & ALI, R. – Binding of human anti-DNA autoantibodies to reactive oxygen species modified DNA and probing oxidative DNA damage in cancer using monoclonal antibody. **Int J. Cancer** **78**, 404-409, 1998a.

- ASHOK, B. T. & ALI, R. – Binding of circulating antibodies to reactive oxygen species modified-DNA and detecting DNA damage by a monoclonal antibody probe. **Mech. Ageing Dev.** **103**, 69-80, 1998b.
- ASHOK, B. T. & ALI, R. – Antigen binding characteristics of experimentally-induced antibodies against hydroxyl radical modified native DNA. **Autoimmunity** (In Press), 1999.
- BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURNUTTE, J.T. – The production by leukocytes of superoxide; A potencial bactericidal agent. **J. Clin. Invest**, **52**: 741-744; 1973.
- BABIOR, B.M. – Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. **N. Engl. J. Med.**, **298**: 659-668, 1978.
- BABIOR, B.M. – Protein phosphorylation and the respiratory burst. **Arch. Biochem. Biophys.** **264**: 361-367, 1988.
- BABIOR, B. M. – NADPH oxidase: an update. **Blood**, **93**: 1464-1476, 1999.
- BAEHNER, R. L.; BOXER, L. A.; ALLEN, J. M.; DAVIS, J. – Autooxidation as a basis for altered function by polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, **50**: 327-35, 1977.
- BAGCHI, D.; HASSOUN, E.A.; BAGCHI, M. & STOHS, S – Chromium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, nitric oxide production, and generation of reactive oxygen species in Sprague-Dawley rats. **Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.** **110**, 177-187, 1995.
- BAGGIOLINI, M.; THELEN, M. – The phagocytes and the respiratory burst. In: SIES, H. ed. **Oxidative stress: oxidants and antioxidants**. London. Academic Press, p. 399-419, 1991.

- BARNETT, Y.A. (1994) Nutrition and the ageing process. **Br. J. Biomed. Sci.** **51(3)**:278-287.
- BARNETT, Y. A. and KING, C. M. – An investigation of antioxidation status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. **Mutat. Res.** **338**, 115, 1995.
- BARROS, S. B. M.; SIMIZU, K.; JUNQUEIRA, V. B.C. – Liver lipid peroxidation-related parameters after short-term administration of hexachlorocyclohexane isomers to rats. **Toxicol. Lett.** **56(1-2)**: 136-144, 1991.
- BEATTIE, B. L.; LOUIE, V. Y.; DWYER, J. – Nutrition and health in the elderly. In: REICHEL, W., ed. – **Care of the elderly: Clinical Aspects of the Aging**. Baltimore, Williams & Wilkins, p. 223-243, 1995.
- BENDICH, A. & BUTTERWORTH, C. E., Jr. – **Micronutrients in Health and in Disease Prevention** (Marcel Dekker, New York), 1991.
- BENZI, G.; MARZATICO, F.; PASTORIS, O.; VILLA, R. F. – Relationship between aging, drug treatment and the cerebral enzymatic antioxidant system. **Exp. Gerontol.**, **24**: 137-148, 1989.
- BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. – Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, **33**: 20313-20316, 1997.
- BERLETT, B. S.; LEVINE, R. L.; STADTMAN, E. R. – Carbon dioxide stimulates peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues and inhibits oxidation of methionine residues of glutamine synthetase: Both modifications mimic effects of adenylation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**: 2784-2789, 1998.
- BERKOW, R. L.; DODSON, R. W.; KRAFT, A. S. – Human neutrophils contain distinct cytosolic and particulate tyrosine kinase activities: possible role in neutrophil activation. **Biochim. Biophys. Acta**. p. 292-301, 1989.

- BERKOW, R. L.; DODSON, R. W. – Tyrosine-specific protein phosphorylation during activation of human neutrophils. **Blood**, **75**: 2445-52, 1990.
- BEUTLER, E. – The preparation of red cells for assay. In: BEUTLER, E., - **Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods**. 2a.ed., New York, Grune and Stratton, p.6-18, 89-90, 1975.
- BILD, D.; FITZPATRICK, A.; FRIED, L. – Age-related trends in cardiovascular morbidity and physical functioning in the elderly: The Cardiovascular Health Study. **J. Am. Geriatr. Soc.** **41**: 1047-1052, 1993.
- BLAKE, D.R.; ALLEN, R.E.; LUNEC, J. – Free radicals in biological systems – a review orientated to inflammatory processes. **British Medical Bulletin**. v. **43**, n.2, p. 371-85, 1987.
- BLOCK, G. – The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. **Nutr. Rev.** **50**, 207-213, 1992.
- BLOCK, G.; PATTERSON, B. & SUBAR, A. – Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. **Nutr. Cancer** **18**, 1-29, 1992.
- BLOT, W.J.; LI, J.Y.; TAYLOR, P.R.; - Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease specific mortality in the general population. **J. Natl. Cancer Inst.**, **85**: 1483-1492, 1993.
- BOVERIS, A.; COSTA, L. E. – The mitochondrial production of oxygen radicals and cellular aging In: **Understanding the Process of Aging. The Roles of Mitochondria , Free Radicals, and Antioxidants**. Copyright by Marcel Dekker, Inc., p. 1-16, 1999.

- BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. – The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochemistry Journal**, **128**(3): 617-630, 1972.
- BOVERIS, A.; VAIDEZ, L. B.; LORES ARNAIS, S.; ALVAREZ, S. and COSTA, L. E. – Biology of Aging and Neurodegenerative Disease: The Mitochondrial Theory. 17th Congress of the International Association of Gerontology Abstracts, p. 320. Vancouver, Canada, July 2001.
- BOXER, L. A.; AXTELL, R.; SUCHARD, S. – The role of the neutrophil in inflammatory diseases of the lung. **Blood Cells** **16**: 25-42, 1990.
- BOYUM, A. – Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by centrifugation; and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scan. J. Clin. Lab. Invest**, **21**: 77-89, 1968.
- BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; and SNYDER, S. H. – Localization of nitric oxide synthase I indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, **347**: 768-770, 1990.
- BRESTEL, E. P. – Co-oxidation of luminol by hypochlorite and hydrogen peroxyde. Implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **1226**: 482-488, 1985.
- BRUNK, U. T.; JONES, C. B.; SOHAL, R. S. – A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. **Mutation Research** **275**: 395-403, 1992.
- BURK, R. F.; NISHIKI, K.; LAWRENCE, R. A.; CHANCE, B. – Peroxide Removal by Selenium-dependent and Selenium-independent Glutathione Peroxidases in Hemoglobin-free Perfused Rat Liver. **J. Biol. Chem.** **253**: 43-46, 1978.
- BURTON, G.W. & INGOLD, K.U. - β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. **Science**, **224**: 569-573, 1984.

- BURTON, G.W.; WEBB, A.; INGOLD, K.A. – A mild, rapid and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. **Lipids**, **20**: 29-39, 1985.
- BURTON, G.W. – Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. **Ann. Rev. Nutr.** **10**: 357-382, 1990.
- BUSCIGLIO, J.; YANKNER, B. A. – Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. **Nature**, **378**: 776-779, 1995.
- BUSCIGLIO, J.; ANDERSEN, J. K.; SCHIPPER, H. M.; GILAD, G. M.; McCARTY, R.; MARZATICO, F. AND TOUSSAINT, O. – Stress, Aging, and Neurodegenerative Disorders. **Ann. New York Acad. Sci.**, p. 429-443, 1999.
- CACHIA, O.; EL BENNA, J.; PEDRUZZI, E.; DESCOMPS, B.; GOUGEROT-POCIDALO, M.; LÉGER, C. – α -Tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. **J. Biol. Chem.**, **273**: 32801-5, 1998.
- CADENAS, E. & PACKER, L. – **Understanding the Process of Aging. The Roles of Mitochondria , Free Radicals, and Antioxidants**. Copyright by Marcel Dekker, Inc., p. iii-viii, 1999.
- CADET, J.; DELATOUR, T.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; POUGET, J.P.; RAVANAT, J. L.; SAUVAIGO, S. – Hydroxyl radicals and DNA base damage. **Mutat. Res.**, **424**(1-2): 9-21, 1999.
- CHAIMOWICZ, R.K. – A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. **Rev. Saúde Públ.**, **31** (2): 184-200, 1997.

- CHAN, S. S.; MONTEIRO, H. P.; DEUCHER, G. P.; ABUD, R. L.; ABUCHALLA, D.; JUNQUEIRA, V. B. C. – Functional activity of blood polymorphonuclear leukocytes as an oxidative stress biomarker in human subjects. **Free Rad. Biol. Med.** **24**: 1411-18, 1998.
- CHAN, S. S.; MONTEIRO, H. P.; SCHINDLER, F.; STERN, A.; JUNQUEIRA, V. B. C. - α -Tocopherol modulates tyrosine phosphorylation in human neutrophils by inhibition of PKC activity and activation of tyrosine phosphatases. **Free Rad. Res.**, **2001** (em publicação).
- CHANCE, B.; BOVERIS, A.; NAKASE, Y.; SIES, H. – Functions of Glutathione in Liver and Kidney, **Proc. Life Sci.**, Berlin/Heidelberg/New York: Springer. – SIES, H.; WENDEL, A.; eds., pp. 95-106, 1978.
- CHANDRA, R. K. - Effect of vitamin and trace-element supplementation on immune responses and infection in elderly subjects. **Lancet**, **340**: 1124-1127, 1992.
- CHEUNG, K.; ARCHIBALD, A. C.; ROBINSON, M. F. – The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **J. Immunol.**, **130**: 2324-2329, 1983.
- CHUNG, M. H.; KASAI, H.; NISHIMURA, S.; YU, B. P. – Protection of DNA damage by dietary restriction. **Free Rad. Biol. Med.** **12**: 523-525, 1992.
- CLARK, R. A. – The human neutrophil respiratory burst oxidase. **J. Infect. Dis.** **161**: 1140-7, 1990.
- COGNY, A.; PAUL, J. L.; SONI, T.; ATGER, V.; MOZTTI, N. – Vitamine E: métabolisme et rôle dans l'athérosclérose. **Ann. Biol. Clin.** **52**: 515-22, 1994.

- COHEN, S. M.; PURTILLO, D. T.; ELLWEIN, L. B. – Ideas in pathology. Pivotal role of increased cell proliferation in human carcinogenesis. **Mod. Pathol.** **4**: 371-382, 1991.
- COMPORTI, M. – Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. **Lab Invest.** **v.53**, p 599-623, 1985.
- COTTEE, F.; FLOWER, R. J.; MONCADA, S.; SALMON, J. A.; VANE, J. R. – Synthesis of 6-keto-PGF_{1α} by ram seminal vesicle microsomes. **Prostaglandins** **14**: 413-23, 1977.
- CROSS, A. R.; JONES, O. T. G. – Enzymic mechanisms of superoxide production. **Biochim. Biophys. Acta**, **1057**: 281-298, 1991.
- CUTLER, R. G. – Peroxide-producing potential of tissues: Correlation with longevity of mammalian species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **82**: 4798-4802, 1985.
- CUTLER, R. G. – Human longevity and aging: possible role of reactive oxygen species. **New York Acad. Sci.** **621**: 1-28, 1991.
- CUTLER, R. G. – Genetic stability and oxidative stress: Common mechanisms in aging and cancer. In I. Emerit, B. Chance (Eds.), **Free Radicals and Aging** (pp. 31-46). Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, 1992.
- DEAN, R. T.; FU, S.; STOCKER, R.; & DAVIES, M. J. – Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochem. J.** **324**, 1-18, 1997.
- DECHALET, L.R.; LONG, G.D.; SHIRLEY, P.S.; BASS, D.A.; THOMAS, M.J.; HENDERSON, F.W.; COHEN, M.S. – Mechanism of luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. **J. Immunology**, **129**: 1589-93, 1982.

- DeJESUS, M. D.; TABATABAI, F. & CHAPMAN, D. J. – Taxonomic distribution of CuZn-superoxide dismutase in green algae and its phylogenetic importance. **J. Phycol.** **25**: 767-772, 1989.
- DE LEO, F. R.; QUINN, M. T. – Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. **J. Leucoc. Biol.** **60**: 677-91, 1996.
- DEVARAJ, S.; ADAMS-HUET, B.; FULLER, C. J.; JIALAL, I. – Dose response comparison of RRR- α -tocopherol and all-racemic α -tocopherol on LDL oxidation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** **17**: 2273-9, 1997.
- DEVASAGAYAM, T. P. A.; STEENKEN, S.; OBENDORF, M. S. W.; SCHULZ, W. A.; SIES, H. – Formulation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. **Biochemistry**, **30**: 6283-6289, 1991.
- DIZDAROGLU, M. – Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins. In: Halliwell, B.; Aruoma, O. I. (Eds.), **DNA and Free Radicals**. Ellis Horwood, Chichester, p. 19-39, 1993.
- DUCHESNE, M. J.; THALER-DAO, H.; de PAULET, A. C. –Prostaglandin Synthesis in Human Placenta and Fetal Membranes. **Prostaglandins** **15**: 19-41, 1978.
- DYKE, K.V. – Soluble and insoluble activators of neutrophil chemiluminescence. In: DYKE, K. V.; CASTRANOVA, V. eds. **Cellular chemiluminescence**. CRC, Boca Raton, Florida v.1, p. 161-72, 1987.
- DYRKS, T.; DYRKS, E.; HARTMANN, T. – Amyloidogenicity of α A4 and β A4-bearing APP fragments by metal catalysed oxidation. **J. Biol. Chem.**, **267**: 18210-18217, 1992.

- ERNSTER, L. - Biochemistry of reoxygenation injury. **Crit. Care Med.**, **16**: 947-953, 1988.
- EASMON, C.S.; COLE, P.J.; WILLIAMS, A.J.; HASTINGS, M. - The measurement of opsonic and phagocytic function by luminol-dependent chemiluminescence. **Immunology**, **41**: 67-74, 1980.
- EATON, J. W. - Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: Mysteries of the bestiary. **J. Lab. Clin. Med.** **118**: 3-4, 1991.
- EDWARDS, S. W. - **Biochemistry and Physiology of the neutrophil**. Cambridge University Press, p. 188-194, 1994.
- EL BENNA, J.; HAN, J.; PARK, J.; SCHMID, E.; ULEVITCH, R. J.; BABIOR, B. M. - Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47^{phox} by p38 and ERK but not by JNK. **Arch. Biochem. Biophys.** **334**: 395-400, 1996.
- EL BENNA, J. E.; DANG, P. M.; GAUDRY, M.; FAY, M.; MOREL, F.; HAKIM, J.; GOUGEROT-POCIDALO, M. - Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67^{phox} during human neutrophil activation. **J. Biol. Chem.** **272**: 17204-8, 1997.
- ESTERBAUER, H.; GEBICKI, J.; PUHL, H.; JÜRGENS, G. - The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Rad. Biol. Med.** **v.13**, p.341-90, 1992.
- FABER, J. L.; KYLE, M. E. & COLEMAN, J. B. - Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Lab. Invest.** **62**: 670-678, 1990.
- FLEMING, J. E.; MIQUEL, J.; COTTREL, S. F.; YENGOYANAND, L.S.; & ECONOMOS, A. C. - Is cell aging caused by respiration dependent injury to mitochondrial genome? **Gerontology** **28**, 44-53, 1982.

- FIALKOW, L.; CHAN, C. K.; ROTIN, D.; GRINSTEIN, S.; DOWLEY, G.P. – Activation of the mitogen-activated protein kinase signalling pathway in neutrophils. **J. Biol. Chem.** **269**: 31234-42, 1994.
- FILLENBAUM, G. G. – **The wellbeing of the elderly. Approaches to multidimensional assessment.** Genebra, World Health Organization, 1984. (WHO Offset publication, 84).
- FLOHE, L.; BENOHR, H.; CH., SIES, H.; WALLER, H.D.; WENDEL, A.; eds. – **Glutathione, Proc. 16 th Conf. German Soc. Biol. Chem. Tubingen, March 1973**, pp. 1-316. Stuttgart: Thieme. – Flohe, L., Gunzler, W.A., pp. 132-45. 1974.
- FLOHE, L. – **CIBA Found . Symp.** **65**: 95-122. New York: Excerpta Medica. 1979.
- FLOHE, L. – **Free Radicals in Aging, vol. 5.** New York: Academic Press, 1982.
- FLOYD, R. A.; LEWIS, C. A. – Hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide by ferrous iron-nucleotide complexes. **Biochemistry** **22**: 2645-2649, 1983.
- FOLSTEIN, M.F.; FOLSTEIN, S.E.; McHUGH, P.R. – "Mini-Mental State": a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinical. **J. Psychiatric Res.**, **12**: 189-198, 1975.
- FORD-HUTCHINSON, A. W.; BRAY, M. A.; DOIG, M. V.; SHYPLEY, M. E.; SMITH, M. J. – Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. **Nature** **286**: 264-265, 1980.
- FREEMAN, B. A.; TOPPOLSKY, M.K.; and CRAPO, J.D. – Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lung homogenates. **Arch. Biochem. Biophys.**, **216**, 477, 1982.

- FREI, B.; KIM, M. C. & AMES, B. N. – Ubiquinol-10 is an effective lipid soluble antioxidant at physiological concentrations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **87**, 4879-4883, 1990.
- FREI, B. & AMES, B. N. – in **The Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems**, eds. Scandalios, J. (Cold Spring Harbor Lab, Press, Plainview, NY), pp. 23-45, 1992.
- FRIDOVICH, I. – Superoxide dismutases. **Adv. Enzymol.** **58**: 61-97, 1986.
- FRIDOVICH, I. – The biology of oxygen radicals. **Science** **201**: 875-880, 1978.
- FUKANAGA, M. & YIELDING, K. L. – Fate during cell growth of yeast mitochondria and nuclear DNA after photolytic attachment of the monazide analog of ethidium. **Biochem. Biophys. Res. Commun** **90**, 582-586, 1979.
- FRITZCHE, R.; DEVECK, A.L. - Chemiluminescence microscopy reveals functional heterogeneity in single neutrophils undergoing oxygen burst. **Eur. J. Immunol.**, **18**: 817-20, 1988.
- FÜLÖP Jr., T.; VARGA, Z.; NAGY, J. T.; FÓRIS, G. - Studies on opsonized zymosan, FMLP, carbachol, PMA and A₂₃₁₈₇ stimulated respiratory burst of human PMNLs. **Bioch. Int.**, **17**: 419-426, 1988.
- FÜLÖP Jr., T.; VARGA, Z.; CSONGOR, J.; FÓRIS, G.; LEÖVEY, A. - Age related impairment in phosphatidylinositol breakdown of polymorphonuclear granulocytes. **FEBS Lett.** **245**: 249-252, 1989.
- GAZIANO, J. M.; MANSON, J. E.; RIDKER, P. M.; BURING, J. E.; HENNEKENS, C. H. - Beta-carotene therapy for chronic stable angina. **Circulation**, **82** (Suppl III): 202- 210, 1991.

- GERSCHMAN, R.; GILBERT, D. L.; NYE, S. W.; DWYER, P.; FENN, W. O. – Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common. **Science** **119**: 623-626, 1954.
- GEY, K. F. - Prevention of early stages of cardiovascular disease and cancer may require concurrent optimization of all major antioxidants and other nutrients: An update and reevaluation of observational data and intervention trials. In: **Free Radicals, Lipoprotein oxidation and Atherosclerosis**. G. BELLOMO, E. MAGGI, and C RICE-EVANS eds, Richelieu Press, London, 1995.
- GIBSON, R.S. – **Principles of nutritional assessment**. New York, Oxford University Press, 1990. 691p.
- GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; PAOLISSO, G. - Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care**, **19**: 257-263, 1996.
- GOMES-CAMBRONERO, J.; HUANG, C. K.; BONAK, V. A.; WANG, E.; CASNIELLE, J. E.; SHIRAISHI, T.; SHA'FI, R. I. – Tyrosine phosphorylation in human neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, p. 1478-85, 1989.
- GOODWIN, J. S.; BLACK, S. A.; SATISH, S. – Aging versus disease: the opinions of older black, Hispanic, and non-hispanic white Americans about the causes and treatment of common medical conditions. **J. Am. Geriatr. Soc.**, **47**: 973-979, 1999.
- GREEN, D.R. and REED, J.C. – Mitochondria and Apoptosis. **Science**, **v.281**, p. 1309, 1998.
- GRISHAM, M. B.; eds. – **Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine**. Austin, R. G. Landes, 1992.
- GRISHAM, M. B.; JEFFERSON, M. M.; MELTON, D. F.; THOMAS, E. L. – Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-

- dependent bactericidal, cytotoxic and cytolytic activities of the chloramines. **J. Biol. Chem.** **259**: 10404-10, 1984.
- GUEMOURI, L., ARTUR, Y., HERBETH, B., JEANDEL, C., CUNY, G., & SIEST, G.- Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. **Clin. Chem.** **37**, 1932-1937, 1991.
- GUZMAN-BARRON, E. S. – **Adv. Enzymol.** **11**: 201-66, 1951.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL; H.B. – **Antioxidants in Nutrition, Health and Disease**. Oxford University Press, Oxford. pp. 110, 1994.
- HALLIWELL, B. – Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB J.** **1**: 358-364, 1987.
- HALLIWELL, B. – How to characterize a biological antioxidant. **Free Rad. Res. Commun.**, **9**: 1-32, 1990.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. – **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3rd ed., Oxford University Press, NY, 1999.
- HALSTENSSEN, A.; HANENBERG, B.; GLETTE, J.; SANDBERG, S.; SOLBERG, C.O. – Factors important for the measurement of chemiluminescence production by polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol. Meth.**, **88**: 121-8, 1986.
- HARMAN, D. – Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. **J. Gerontol.** **11**: 298-300, 1956.
- HARMAN, D. – The biological clock: The mitochondria. **J. Am. Geriatr. Soc.** **20**, 145-147, 1972.
- HARMAN, D. – The aging process. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **78**: 7124-7128, 1981.

- HARMAN, D. – The aging process: major risk factor for disease and death. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**: 5360-5363, 1991.
- HAYFLICK, L. – **Como e por que envelhecemos**. Rio de Janeiro, Editora Campus, p. 366, 1996.
- HAYFLICK, L. – How and Why We Age. **Experimental Gerontology** **33**:639, 1998.
- HEINONEN, A. - The effect of vitamin E and β -carotene on the incidence of lung cancer and other cancer in male smokers - **N. Engl. J. Med.** **330**:1029-1035, 1994.
- HENNEKENS, C. H.; BURING, J.E .; MANSON, J.E ., RIDKENR, P. M.; GAZIANO, J. M. – Lack of effect of long-term supplementation with beta-carotene on the incidence of malignant neoplasmas and cardiovascular disease. **N. Engl. J. Med.**, **334**: 1145-1149, 1996.
- HESEKER, H.& SCHNEIDER, R. – Requirements and supply of vitamin C, E and beta-carotene for elderly men and women. **Eur. J. Clin. Nutr.**, **48**(2): 118-127, 1994.
- HEMMENS, B.; MAYER, B. – Enzymology to nitric oxide synthases. **Nitric Oxide Protocols**. M. A. Titheradge. Totowa, Humana Pres Inc. 100: 1-32, 1998.
- HIJMANS, W.; RADL, J.; BOTTAZZO, G. F.; & DONIACH, D. – Autoantibodies in highly aged humans. **Mech. Ageing Dev.** **26**, 83-89, 1984.
- HOLMES, G. E.; BERNSTEIN, C.; & BERNSTEIN, H. – Oxidative and other DNA damages as the basis of aging: A review. **Mutation Res.** **275**, 305-315, 1992.
- HUG, H.; SARRE, T. F. – Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction. **Biochem. J.** **291**: 329-43, 1993.

- HUMMENT, M. L.; GARSBA, T. A.; SHANER, J. L.; STRAHM, S. – Stereotypes of the elderly held by young, middle-aged and elderly adults. **J. Gerontol. Psychol. Sci.**, **49**: 240-249, 1994.
- IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. – Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**: 9265-9269, 1987.
- JACQUES, P. F.; HALPNER, A. D.; BLUMBERG, J. B. – Influence of combined antioxidant nutrient intakes on their plasma concentrations in an elderly population. **Am. J. Clin. Nutr.**, **62**: 1228-1233, 1995.
- JAFFE, G.M. In: MACHLIN, L.J. ed. – **Handbook of vitamins: Nutritional, Biochemical, and Clinical Aspects**. New York, p. 199-244, 1984.
- JAMA, J. W. Et al. – Dietary antioxidants and cognitive function in a population-based sample of older persons. The Rotterdam study. **Am. J. Epidemiol.** **144**: 275 {also see *Arch. Neurol.* **54**: 762 (1997)}, 1996.
- JELLIFFE, D.B. & JELLIFFE, E.F.P. – **Community Nutritional Assessment: with especial reference to less technically developed countries**. Oxford University Press, 1989. 633p.
- JUNQUEIRA, V. B. C.; SIMIZU, K.; VAN HALSEM, A. L.; KOCH, O. R.; BARROS, S. B. M.; VIDELA, L. A. – Lindane-induced oxidative stress: I. Time course of change in hepatic microsomal parameters, antioxidant enzymes, lipid peroxidation indices and morphologic characteristics. **Xenobiotica** **18**(11): 1297-1304, 1986a.
- JUNQUEIRA, V. B. C.; SIMIZU, K.; VIDELA, L. A.; BARROS, S. B. M. – Dose-dependent study of the effects of acute lindane administration on rat liver

- superoxide anion production, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. **Toxicology** **41**: 193-204, 1986b.
- KAGAN, V.E.; D. A. STOYANOVSKY, ET AL. – Integrated functions of coenzyme Q and vitamin E in antioxidant action. **Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology**. H. N. Esterbauer and C. Rice-Evans. London, Richelieu Press: 221-248, 1994.
- KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.; FORTE, T.; SCITA, G.; PACKER, L. – Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. **J. Lipid Res.** **33**: 385-97, 1992.
- KALMIJN, S.; FESKENS, E. J.; LAUNER, L. J.; KROMHOUT, M. – Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men. **Am. J. Epidemiol.**, **145**: 33-41, 1997.
- KAMATA, M.; HIRATA, H. – Redox regulation of cellular signalling. **Cell signal.** **11**: 1-14, 1999.
- KANE, R. A. & KANE, R. L. – **Assessing the elderly: a practical guide to measurement**. Toronto, Lexington Books, 1981.
- KANNO, T.; UTSUMI, T.; KOBUCHI, H.; TAKEHARA, Y.; AKIYAMA, J.; YOSHIOKA, T.; HORTON, A. A.; UTSIMU, K. – Inhibition of stimulus-specific neutrophils superoxide generation by alpha-tocopherol. **Free Rad. Res.** **22**: 431-40, 1995.
- KAY, M. M. B.; BOSMAN, G. J. G. C. M.; SHAPIRO, S. S.; BENDICH, A.; BASSEL, P.S. – Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: Vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **83**: 2463-2467, 1986.
- KEHRER, J.P. – Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Crit. Rev. Toxicol.** **23**: 21-48, 1993.

- KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. – Superoxide-dependent hydroxylation by myeloperoxidase. **J. Biol. Chem.** **269**: 17146-53, 1994.
- KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. – Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. **Redox Rep.** **3**: 3-8, 1997.
- KING, C. M.; GILLESPIE, E. S.; McKENNA, P. G.; & BARNETT, Y. A. – An investigation of mutation as a function of age in humans. **Mutation Res.** **316**, 79-90, 1994.
- KIRKWOOD, T. B. L. – Comparative life spans of species: Why do species have the life spans they do? **Am. J. Clin. Nutr.** **55**(Suppl. 6): 1191S-1195S, 1992.
- KIRKWOOD, T. B. L. – Towards a unified theory of cellular ageing. **Monogr. Dev. Biol.** **17**, 9-20, 1984.
- KITSIS, E.; WEISSMANN, G. – The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis. **Clin. Orthoped. Related Res.**, p. 63-72, 1991.
- KIVIRIKKO, K. I.; PROCKOP, D.J. – Enzymatic hydroxylation of proline and lysine in procollagen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **57**, 782-789, 1967.
- KLAUNING, J. E.; XU, Y.; ISENBERG, J. S.; BACHOSKI, S.; KOLAJA, K. L.; JIANG, J.; STEVENSON, D. E. & WALBORG, E. F. Jr. – The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. **Environ. Health Perspec.** **106**: 289-295, 1998.
- KLEBANOFF, S. J. – Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. **J. Bacteriol.** **95**: 2131-5, 1968.
- KLEBANOFF, S. J. – Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. **Ann. Intern. Med.** **93**: 480-7, 1980.

- KNEKT, P.; REUNANEN, A.; JÄRVINEN, R.; SEPPÄNEN, R.; HELIÖVAARA, M.; AROMAA, A. – Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. **Am. J. Epidemiol.**, **139**(12): 1180-1189, 1994.
- KNOX, W. E. – **Enzymes (Part A)**, **2**: 253-94, 1960.
- KOHEN, R.; YAMAMOTO, Y.; CUNDY, K. & AMES, B. N. – Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85**, 3175-3179, 1988.
- KOIZUMI, A.; WEINDRUCH, R.; WALFORD, R. L. – Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. **J. Nutr.** **117**: 361-367, 1987.
- KOSTNER, G. M.; OETTL, K.; JAUHIAINEN, M.; EHNHOLM, C.; ESTEBAUER, H.; DIEPLINGER, H. – Human plasma phospholipid transfer protein accelerates exchange/transfer of α -tocopherol between lipoproteins and cells. **Biochem. J.** **305**: 659-67, 1995.
- KOZARICH, J. W.; CHARI, R. V. J. – **J. Am. Chem. Soc.** **104**: 2655-57, 1982.
- KRINSKY, N. I. – Actions of carotenoids in biological systems. **Annu. Rev. Nutr.** **13**: 561-87, 1993.
- KRINSKY, N. & SIES, H. – Antioxidants vitamins and beta-carotene in disease prevention. **Am. J. Clin. Nutr.**, **62** (Suppl.):1299S-1540S, 1995.
- KUSUNOKI, T.; HIGASHI, H.; HOSOI, S.; HATA, D.; SUGIE, K. – Tyrosine phosphorylation and its possible role in superoxide production by human neutrophils stimulated with FMLP and IgC. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, **183**: 789-796, 1992.

- KUIJK, F. J. G. M.; SEVANIAN, A.; HANDELMAN, G. J.; DRATZ, E. A. – A new role for phospholipase A₂: Protection of membranes from lipid peroxidation damage. **TIBS**. **12**: 31-34, 1987.
- LABADIA, M. E.; ZU, Y.; HUANG, C. – A synthetic peptide containing a predominant protein kinase C site within p47^{phox} inhibits the NADPH oxidase in intact neutrophils. **J. Leukoc. Biol.** **59**: 116-24, 1996.
- LANG, J.K.; GOHIL, K; PACKER, L. – Simultaneous determination of tocopherols and ubiquinones in blood plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. **Anal. Biochem.**, **157**: 106-116, 1986.
- LAWRENCE, R.A.; BURK, R. F. – Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **71**: 952-58, 1976.
- LÉGER, C. L. – Vitamin E, tocopherols, composés apparentés et structure membranaire. In: **Vitamin E, tocopherols et composés apparentés**. C. L. Léger, ed. Polytechnica, Paris, 1992.
- LEVINE, M.; MORITA, K. – Ascorbic acid in endocrine systems. **Vitam. Horm.** **42**: 1-64, 1985.
- LEVINE, M.; MORITA, K.; POLLARD, H. B. – Enhancement of norepinephrine biosynthesis by ascorbic acid in cultured bovine chromaffin cells. **J. Biol. Chem.** **260**, 12942-7, 1985.
- LEVINE, M. – Ascorbic acid specifically enhances dopamine beta-monooxygenase activity in resting and stimulated chromaffin cells. **J. Biol. Chem** **261**: 7347-56, 1986.
- LEVINE, M.; MORITA, K.; HELDMAN, E.; POLLARD, H. B. – Ascorbic acid regulation of norepinephrine biosynthesis in isolated chromaffin granules from bovine adrenal medulla. **J. Biol. Chem.** **260**, 15598-603, 1985.

- LEVINE, M.; DHARIWAL, R. K.; WELCH, R. W.; WANG, Y. and PARK, J. B. - Determination of optimal vitamin C requirements in humans. **Am. J. Clin. Nutr.** **62 (Suppl)**: 1347S-56S, 1995.
- LEVY, M.Z., ALLSOPP, R.C., FUTCHER, A.B., GREIDER, C.W., HARLEY, C.B. – Telomere end replication problem and cell aging. **J. Molec. Biol.**, **225**: 951-960.
- LIEBLER, D. C. ; BURR, J. A. – Oxidation of vitamin E during iron-catalyzed lipid peroxidation: evidence for electron-transfer reactions of the tocopheroxyl radical. **Biochemistry** **31**: 8278-8242, 1992.
- LLOYD, D. R.; PHILLIPS, D. H. – Oxidative DNA damage mediate by copper II, iron II and/nickel II Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. **Mutat. Res.**, **424**: 23-36, 1999.
- LOMBARDI, D.; GAETANI, P.; MARZATICO, F.; CAFE, C.; RODRIGUEZ Y BAENA, R. – Effect of high-dose methylprednisolone on antioxidant enzymes after experimental SAH. **J. Neurol. Sci.**, **111**: 130-139, 1992.
- LU, C. Y.; LEE, H. C.; FAHN, H. J.; WEI, Y. H. – Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. **Mutat. Res.**, **423(1-2)**: 11-21, 1999.
- LUDMAN, E. K. & NEWMAN, J. M. – Frail elderly: assessment of nutritional needs. **Gerontologist**, **26**: 198-202, 1986.
- LUNEC, J. – Free radicals: Their involvement in disease processes. **Ann. Clin. Biochem.** **27**: 173-182, 1990.
- LUTZ, W. K.; SCLATTER, J. – Chemical carcinogens and overnutrition in diet-related cancer. **Carcinogenesis** **13(12)**: 2211-2216, 1992.

- MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. – Free radicals tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB J.** **1**: 441-445, 1987.
- McCAFFERTY, A. C.; CREE, I. A.; McMURDO, M. E. T. - The influence of age and sex on phagocyte chemiluminescence. **J. Biolumin. Chemilumin.****10**, 41-48, 1995.
- McDERMOTT, J.H. - Antioxidant Nutrients: Current Dietary Recommendations and Research Update. **J. Am. Pharm. Assoc.** **40**(6): 785-799, 2000..
- MANOUSSAKIS, M. N.; STAVROPOULOS, E. D.; GERMINIDIS, G.S.; PAPASTERIADES, C.A.; GARALEA, K.L.; DONTAS, A.S.; & MOUTSOPOULOS, H. M. – Soluble interleukin-2 and autoantibodies in the serum of healthy elderly individuals. **Autoimmunity** **7**, 129-137, 1990.
- MARIDONEAU-PARINI, I.; TAUBER, A. I. – Activation of NADPH-oxidase by arachidonic acid involves phospholipase A₂ intact human neutrophil but not in the cell-free system. **Byochem. Biophys. Res.** **138**: 1099-1105, 1986.
- MARKESBERY, W. R. – Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. **Free Radical Biol. Med.**, **23**: 134-147, 1997.
- MARNETT, L. J.; BUCK, J.; TUTTLE, M. A.; BASU, A. K.; BULL, A. W. – Distribution and oxidation of malodiadehyde in mice. **Prostaglandins** **30**: 241, 1985.
- MASAKI, K. H.; WHITE, L. R.; PETROVICH, H. – The influence of prior and concurrent use of aspirin and vitamins on cognitive function scores in elderly Japanese-american men. **Neurobiol. Aging**, **15**: S1-S6, 1994.
- MASAKI, K. H.; WHITE, L. R.; PETROVICH, H. – Superior cognitive functioning in later life. **Neurol.**, **45**(Suppl. 4): A271-A272, 1995.

- MECOCCI, P.; MacGARVEY, U.; KAUFMAN, A. E.; KOONTZ, D.; SHOFFNER, J. M.; WALLACE, D. C.; BEAL, M. F. – Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. **Ann. Neurol.** **34**: 609-616, 1993.
- MECOCCI, P.; MacGARVEY, U.; BEAL, M. F. – Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. **Ann. Neurol.**, **36**: 747-751, 1994.
- MECOCCI, P.; POLIDORI, M. C.; TROIANO, L.; CHERUBINI, A.; CECCHETTI, R.; PINI, G.; STRAATMAN, M.; MONTI, D.; STAHL, W.; SIES, H.; FRANCESCHI, C.; SENIN, U. – Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. **Free Rad. Biol. Med.** **28**: 1243-1248, 2000.
- MEDINA, J.J. – **The clock of ages**. United Kingdom, Cambridge University Press, 1996, 332p.
- MELLO-FILHO, A. C.; MENECHINI, R. – In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. **Biochem. Biophys. Acta** **781**: 56-63, 1984.
- MENECHINI, R. – Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells. **Mutat. Res.** **195**: 215-230, 1988.
- MEZZETTI, A.; LAFENNA, D.; ROMANO, F.; COSTANTINI, F.; PIERDOMENICO, S. D.; CESARE, D. D.; CUCCURULLO, F.; RIARIO-SFORZA, G.; ZULIANI, G.; FELLIN, R. – Systemic oxidative stress and its relationship with age and illness. **J. Am. Geriatr. Soc.** **44**: 823-827, 1996.
- MEYDANI, S. N.; MEYDANI, M.; BARKLAND, M. P.; LIU, S.; MILLER, R. A.; CANNON, J. G.; ROCKLIN, R.; BLUMBERG, J. B. – Effects of vitamin E

- MEYDANI, S. N.; MEYDANI, M.; BARKLAND, M. P.; LIU, S.; MILLER, R. A.; CANNON, J. G.; ROCKLIN, R.; BLUMBERG, J. B. – Effects of vitamin E supplementation on immune responsiveness of the aged. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **570**: 283-290, 1989.
- MEYDANI, S. N.; BARKLAND, M. P.; LIU, S.; MEYDANI, M.; MILLER, R. A.; CANNON, J. G.; MORROW, F.D.; ROCKLIN, R.; BLUMBERG, J. B. – Vitamin E supplementation enhances cell mediated immunity in health elderly subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, **52**: 557-563, 1990.
- MEYDANI, S.N.; MEYDANI, M.; BLUMBERG, J.B.; LEKA, L.S.; SIBER, G.; LOSZEWKI, R.; THOMPSON, C.; PEDROSA, M.C.; DIAMOND, R.D.; STOLLAR, D. - Vitamin E supplementation and in vivo immune response in health elderly subjects. **J.A.M.A**, **277**: 1380-1386, 1997.
- McCANN, S. M. and RETTORI, V. – The role of oxide nitric in reproduction. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **211**: 7-15, 1996.
- McCANN, S. M.; LICINIO, J.; WONG, M.-L.; YU, W. H.; KARANTH, S. & RETTORRI, V. – The nitric oxide hypothesis of aging. **Experimental Gerontology** **33**: 813-826, 1998.
- McCORD, J.M. & FRIDOVICH, I. – The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. **J. Biol. Chem.** **243**: 5753-60, 1968.
- McCORD, J.M. & FRIDOVICH, I. – Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, **244**: 6049-6055, 1969.
- McCORD, J. M. – Oxygen derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. **Fed. Poc.**, **46(7)**: 2402-2406, 1987.
- McDONALD, L. J. and MURAD, F. – Nitric oxide and cyclic GMP signaling. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **211**: 1-6, 1996.

- McPHAIL, L. C.; ELLENBURG, M. D.; LEONE, P.A.; AGWU, D. E.; McCALL, C. E.; QUALLIOTINE-MANN, D.; STRUM, S. L. – Molecular mechanisms of activation of leukocyte superoxide production. In: JESAITS, A.J.; DRATZ, E. A. eds. **The molecular basis of oxidative damage by leukocytes**. New York, CRC Press, p. 11-24, 1991.
- MIRANDA, S.; OPAZO, C.; LARRONDO, L. F.; MUÑOZ, F. J.; RUIZ, F.; LEIGHTON, F.; INESTROSA, N. C. - The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid β -peptide in Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology** **62**, 633-648, 2000.
- MIQUEL, J.; ECONOMOS, A.C.; FLEMING, J.; & JOHNSON, J. E. Jr. – Mitochondrial role in cell ageing. **Exp. Gerontol** **15**, 575-591, 1980.
- MIQUEL, J. & FLEMING, J. E. – A two-step hypothesis on the mechanism of *in vitro* cell aging: Cell differentiation followed by intrinsic mutagenesis. **Exp. Gerontol.** **19**, 31-36, 1984.
- MIQUEL, J. & FLEMING, J. E. – Theoretical and experimental support for an "oxygen radical-mitochondrial injury" hypothesis of cell aging. In J. E. Johnson, Jr.; R. Walford, D. Harman, J. Miquel (Eds.), **Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases (pp. 51-74)**. New York: Alan R. Liss, 1986.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. – Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, **43**(2): 109-142, 1991.

- MONGET, A. L.; RICHARD, M. J.; COURNOT, M. P.; ARNAUD, J.; GALAN, P.; PREZIOSI, P.; HERBETH, B.; FAVIER, A.; HERBERG, S. – Effect of 6 month supplementation with different combinations of an association of antioxidant nutrients on biochemical parameters and markers of the antioxidant defence system in the elderly. **Eur. J. Clin. Nutr.**, **50**: 443-449, 1996.
- MOTCHINIK, P.A.; FREI, B.; AMES, B.N. – Measurement of antioxidants in human blood plasma. **Methods in Enzimology**, **234**: 269-279, 1994.
- MORRISSEY, P. A. & SHEEHY, P. J. – Optimal nutrition: vitamin E. **Proc. Nutr. Soc.**, **58**(2): 459-468, 1999.
- MUNRO, H. N. – Major gaps in nutrient allowances. **J. Am. Diet. Assoc.**, **76**: 137-140, 1980.
- MUNRO, H. N. & DANFORD, D. E. – Nutrition, aging and the elderly. In: **Human nutrition: a comprehensive treatise**. New York, Plenum Press, 1989.
- MURPHY, S. P.; SUBAR, A. F.; BLOCK, G. – Vitamin E intakes and sources in the United States. **Am. J. Clin. Nutr.**, **52**: 361-367, 1990.
- MYLLYLÄ, R.; KUUTTI-SAVOLAINEN, E-R.; KIVIRIKKO, K. I. – The role of ascorbate in the prolyl hydroxylase reaction. **Biochem. Biophys. Res. Commun** **83**, 441-448, 1978.
- NAJAS, M.S.; ANDREAZZA, R.; SOUZA, A.L.M.; SACHS, A.; GUEDES, A.C.B.; SAMPAIO, L.R.; RAMOS, L.R.; TUDISCO, E.S. – Padrão alimentar de idosos de diferentes estratos socioeconômicos residentes em localidade urbana de região sudeste, Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, **28**: 187-191, 1994.
- NAKANO, M.; OENZIL, F.; KISHIKAWA, M. & MIZUNO – Age-related accumulation of lipofuscin in three different regions of rat brain. **Mech. Ageing Dev.** **76**(2-3): 157-163, 1994.

- NALECZ, K. A.; NALECZ, M. J.; AZZI, A. – Isolation of tocopherol-binding proteins from the cytosol of smooth muscle A7r5 cell. **Eur. J. Biochem.** **209**: 37-42, 1992.
- NISHIKURA, Y. – The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. **Nature** **334**: 661-5, 1988.
- NOHL, H.; BREUNINGER, V.; HEGNER, D. – Influence of mitochondrial radical formation on energy-linked respiration. **Eur. J. Biochem** **90**: 385-390, 1978.
- NOHL, H.; HEGNER, D. – Do mitochondria produce oxygen radical *in vivo*? **Eur. J. Biochem.** **82**: 563-567, 1978.
- NUGTEREN, D. H.; HAZELHOF, E. – Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. **Biochim. Biophys. Acta** **326**: 448-61, 1973.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. – Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.**, **95**: 351-358, 1979.
- OKANO, T.; TAMAI, H.; MINO, M. – Superoxide generation in leukocytes and vitamin E. **Int. J. Vit. Nutr. Res.**, **61**: 20-6, 1991.
- OLINSKI, R.; ZASTAWNY, T.; BUDZBON, J.; SKOKOWSKI, J.; ZEGARSKI, W.; DIZDAROGLU, M. – DNA base modification in chromatin of human cancerous tissues. **FEBS Lett.** **309**: 193-198, 1992.
- OLIVER, C. N.; AHN, B. W.; MOERMAN, E. J.; GOLDSTEIN, S; STADTMAN, E. T. – Age-related changes in oxidized proteins. **J. Biol. Chem** **262**: 5488-5491, 1987.
- OMENN, G.; GOODMAN, G.; THORNQUIST, M.D. - Effects of a combination of β -carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. **N. ENG. J. Med.** **334** (18): 1189-1190, 1996.

- ORGEL, L. E. – The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **49**: 517-521, 1963.
- PANSARASA, O.; BERTORELLI, L.; VECCHIET, J; FELZANI, G; MARZATICO, F.
– Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. **Free Radic. Biol. Med**, **27**(5-6): 617-622, 1999.
- PAOLISSO, G.; TAGLIAMONTE, M. R.; RIZZO, M. R.; MANZELLA, D.; GAMBARDELLA, A.; VARRICCHIO, M. – Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians. **J. Am. Geriatr. Soc.**, **46**: 833-838, 1998.
- PAPAS, A. M. – Diet and Antioxidant Status. In: **Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health**. CRC Press LLC. Boca Raton. London, New York, Washington, D. C., p. 89-106, 1999.
- PEREZ-CAMPO, R.; LOPEZ-TORRES, M.; CADENAS, S.; ROJAS, C.; AND BARJA, G. – The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. **J. Comp. Physiol. B**. **168**: 149-158, 1998.
- PERKINS, A. J.; HENDRIE, H. C.; CALLAHAN, C. M.; GAO, S.; UNVERZAGT, F. W.; XU, Y.; HALL, K. S.; HUI, S. L. – Association of antioxidants with memory in a multiethnic elderly sample using the third national health and nutritional examination survey. **Am. J. Epidemiol.**, **150**(1): 37-44, 1999.
- PERRIG, W. J.; PERRIG, P.; STÄHELIN, H. B. – The relation between antioxidants and memory performance in the old and very old. **J. Am. Geriatr. Soc.**, **45**(6): 718-724, 1997.

- PETERKOFISKY, B.; UDENFRIEND, S. - Enzymatic hydroxylation of proline microsomal polypeptide leading to formation of collagen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **53**, 335-42, 1965.
- PORTA, E. A. - Role of oxidative damage in the aging process. **Cellular Antioxidant Defense Mechanisms**. C. K. Chow. Boca Raton, CRC Press III: 1-52, 1988.
- PORTER, N. A. - Chemistry of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.** **105**: 273-282, 1984.
- RADI, R.; COSGROVE, T. P.; BECKMAN, J. S.; FREEMAN, B. A. - Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. **Biochem. J.** **290**: 51-57, 1993.
- RAMOS, C. L.; POU, S.; BRITIGAN, B. E.; COHEN, M. S.; ROSEN, G. M. - Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. **J. Biol. Chem.** **267**: 8307-12, 1992.
- RAMOS, L.R. - **A saúde do idoso no Brasil: uma visão clínico-epidemiológica**. São Paulo, 1997. (Tese - Livre Docência - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina).
- RAMOS, L.R.; TONIOLO, J.; CENDOROGLO, M.; GARCIA, J.T.; NAJAS, M.S.; PERRACINI, M.; PAOLA, C.R.; SANTOS, F.C.; BILTON, T.; EBEL, S.J.; ALMADA, C.M.; NASRI, F.; MIRANDA, R.D.; GONÇALVES, M.; SANTOS, A.L.; FRAIETTA, R.; VIVACQUA, I.; ALVES, M.C.; TUDISCO, E.S. - Two-year follow-up study of elderly residents in São Paulo, Brazil (Epidoso Project): methodology and preliminary results. **Rev. Saúde Pública**, **32**(5): 397-407, 1998.

- REFSGAARD, H. H. F.; TSAI, L.; STADTMAN, E. R. – Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **97**(2): 611-616, 2000.
- REITER, R. T. – Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. **FASEB J.**, **9**(7): 526-533, 1995.
- RICCIARELLI, R.; AZZI, A. – Regulation of recombinant PKC α activity by protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2 A. INI, 1988; AMES & GODNA is extensive. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85**: 6465-6467, 1988.
- RICHTER, C. – Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** **27**, 647-653, 1995.
- RIEDL, S. J.; SALVESEN, G. S.; RENATUS, M. & STENNICKE, H. R. – **To Liver or to Die: Regulation of Apoptosis Revealed at the Molecular Level**. The Burnham Institute, USA. XXX Reunião Anual SBBq (Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular), 2001.
- RIKANS, L. E.; HORNBROOK, K. R. - Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. **Biochim. Biophys. Acta.** **1362**(2-3): 116-127, 1997.
- ROE, F. J. C.; LEE, P. N.; CONYBEARE, G.; TOBIN, G.; KELLY, D.; PRENTICE, D.; MATTER, B. – Risks of premature death and cancer predict by body weight in early adult life. **Hum. Exp. Toxicol** **10**: 285-288, 1991.
- ROLLET, E.; CAON, A.; ROBERGE, C. J.; LIAO, N. W.; MALAWISTA, S. E.; MCCOLL, S. R.; NACCACHE, P. H. – Tyrosine phosphorylation in activated human neutrophils: comparison of the signalling pathways involved. **J. Immunol.** **153**: 3533-63, 1994.
- ROSE, N. R. – Thymus function, ageing and autoimmunity. **Immunol. Lett** **40**, 225-230, 1994.

- ROSEN, G. M.; POU, S.; RAMOS, C. L.; COHEN, M. S.; BRITIGAN, B. E. – Free radicals and phagocytes cells. **FASEB J.** **9**: 200-209, 1995.
- ROSENBERG, I. H. – Nutrition assessment of elderly populations. In: **Bristol-Myers Squibb/Mead Johnson Nutrition Symposia**. New York , Raven Press, 1995.
- ROWLATT, C. & FRANKS, L.M. – El envejecimiento de tejidos y células. In: BROCKLEHURST, J.C., ED. – **Tratado de Clínica Geriátrica y Gerontología**. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, Panamericana, 1975. p. 13-28.
- RUSO, M.; TEIXEIRA, H. C.; MARCONDES, M. C. G.; BARBUTTO, J. A. M. – Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. **Bras. J. Med. Biol. Res.** **22**: 1271-1273, 1989.
- SAEED, S. A.; CUTHBERT, J. – On the mode of action and biochemical properties of anti-inflammatory drugs – II. **Prostaglandins** **13**: 565-75, 1977.
- SAKAMOTO, W.; FUJIE, K.; HANDA, H.; OGIHARA, T.; MINO, M. – In vivo inhibition of superoxide production and protein kinase C activity in macrophages from vitamin E-treated rats. **Int. J. Vit. Nutr. Res.** **60**: 338-342, 1990.
- SANO, M.; ERNESTO, C.; THOMAS, R. G.; KLAUBER, M. R.; SCHAFER, K.; GRUNDMAN, M.; WOODBURY, P.; GROWDON, J.; COTMAN, C. H.; PFEIFFER, E.; SCHNEIDER, L. S. – A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. **N. Engl. Med. J.**, **336**: 1216-1222, 1997.

- SAWADA, M.; CARLSON, J. C. – Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the life time of the rat. **Mech. Ageing Dev.** **41**: 125-137, 1987.
- SCHAFER, L. & THORLING, E. B. – Lipid peroxidation and antioxidant supplementation in old age. **J. Clin. Lab. Invest** **50**: 69-75, 1990.
- SCHNEIDER, E. L. – **Theories of aging : a perspective**. In H. R. Warner, R. N. Butler, R. L. Sprott, E. L. Schneider (Eds.), (pp.1-4). Raven Press, 1987.
- SCHULLER, E.; ALLINQUANT, B.; REBOUL, J.; FOURNIER, C.; DARDENNE, M.; & BACH, J. F. – Immunological studies in human ageing. II. Associated increase in anti-RNA and anti-DNA antibodies. **J. Clin. Lab. Immunol.** **6**, 107-110, 1981.
- SHI, X.; MAO, Y.; KNAPTON, A. D.; et al. – Reaction of Cr(VI) with ascorbate and hydrogen peroxide generates hydroxyl radicals and causes DNA damage: role for a Cr(VI)-mediated Fenton-like reaction. **Carcinogenesis** **15**: 2475-2478, 1994.
- SHORT, R.; WILLIAMS, D. D.; BOWDEN, D. M. - Circulating antioxidants a determinants of the rate of biological aging in pigtailed macaque (*Macaca nemestina*). **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.** **52**: B26-38, 1997.
- SIES, H.; WENDEL, A.; eds. – Functions of Glutathione in Liver and Kidney, **Proc. Life Sci.**, pp. 1-212. Berlin/Heidelberg/New York: Springer. – Chance, B., Boveris, A., Nakase, Y., Sies, H., pp. 95-106. 1978.
- SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. – Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letts.**, **103**: 287-290, 1979.

- SIES, H. – Strategies of antioxidant defense . **European Journal of Biochemistry**, **215**: 213-219, 1993.
- SIMIC, M.G. & BERGTOLD, D. S. – Urinary biomarkers of oxidative DNA base damage and human caloric intake. In L. Fishbein (Ed.), **Biological Effects of Dietary Restriction** (pp. 217-225). New York: Springer-Verlag, 1991.
- SIMONS, L. A.; VON KONIGSMARK, M.; SIMONS, J; STOCKER, R.; CELERMAJER, D. S. – Vitamin E ingestion does not improve arterial endothelial dysfunction in older adults. **Atherosclerosis**, **143**(1): 193-199, 1999.
- SLATER, T. F. – Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochem. J.** **222**: 1-15, 1984.
- SLATER, T. F. & BLOCK, G – Antioxidants vitamins and beta-carotene in disease prevention. **Am. J. Clin. Nutr.**, **53**: 189S-396S, 1991.
- SNOWDON, D. A.; GROSS, M. D.; BUTLER, S. M. – Antioxidants and reduced functional capacity in the elderly: findings from the nun study. **J. Gerontol.** **51A**. M10, 1996.
- SOHAL, R.S.; ARNOLD, L. A.; SOHAL, B. A. – Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. **Free Radical Biol. Med.** **10**: 495-500, 1990.
- SOHAL, R.S. – Hydrogen peroxide production by mitochondria may be a biomarker of aging. **Mech. Ageing Dev.** **60**: 189-198, 1991.
- SOHAL, R.S. and WEINDRUCH, R. – Oxidative stress, caloric restriction and aging. **Science** **273**, 59, 1996.

- SOUZA-PINTO, N. C.; CROTEAU, D. L.; HUDSON, E. K.; HANSFORD, R. G.; BOHR, V. A. - Age-associated increase in 8-oxo-deoxyguanosine glycosylase/AP lyase activity in rat mitochondria. **Nucleic Acids Research**, **27**(8):1935-1942, 1999.
- SRIVASTAVA, S.; PHADKE, R. S.; GOVIL G. - Effect of incorporation of drugs, vitamins and peptides on the structure and dynamics of lipids assemblies. **Mol. Cell Biocem.** **91**: 99-109, 1989.
- STADTMAN, E. R. - Covalent modification reactions are making steps in protein turnover. **Biochemistry** **29**: 6323, 1990.
- STADTMAN, E. R. - Protein oxidation and aging. **Science** **257**: 1220-1224, 1992.
- STADTMAN, E. R. & BERLETT, B. S. - Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. **Chem. Res. Toxicol.** **10**: 485, 1997.
- STADTMAN, E. R. & BERLETT, B. S. - Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. **Drug Metab. Rev.** **30**: 225-243, 1998.
- STAHL, W., SIES, H. - Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. **J. Nutr.** **122**: 2161-66, 1992.
- STAHL, W., SCHWARZ, W., SIES, H. - Human serum concentrations of all-trans β - and α -carotene but not 9-cis β -carotene increase upon ingestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina* (Betatene). **J. Nutr.** **123**: 847-51, 1993.
- STAHL, W., SCHWARZ, W., VON LAAR, J., SIES, H. - All-trans β -carotene preferentially accumulates in human chylomicrons and very low density lipoproteins compared with the 9-cis geometrical isomer. **J. Nutr.**, **125**: 2128-33. 1995.

- STAHL, W. and H. SIES – Lycopene: a biological important carotenoid for humans? **Arch. Biochem. Biophys.** **336** (1): 1-9, 1996.
- STAMPFER, M. J. & RIMM, E. B. – Epidemiologic evidence for vitamin E in the prevention of cardiovascular disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, **62**(Suppl.): S1365-S1369, 1995.
- STEINBERG, M. J.; KHAN, A. U.; KARNOVSKY, M. J. – Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. **J. Biol. Chem.** **267**: 13425-32, 1992.
- STEPHENS, N. G. ET AL. – randomized controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). **Lancet**, **347**: 781, 1996.
- STEVENS, P. – Lucigenin and luminol-dependent chemiluminescence to selectively differentiate the oxidative pathways of phagocytic cells. In: VAN DIKE, K.; CASTRANOVA, V. eds. **Cellular Chemilunescence**. Florida, CRC Press, 1987, 105-12.
- STOCKER, R.; YAMAMOTO, Y.; McDONAGH, A.F.; GLAZER, A.N. & AMES, B. N. – Bilirubin Is an Antioxidant of Possible Physiological Importance. **Science** **235**, 1043-1045, 1987.
- STOCKER, R.; BOWRY, V. & FREI, B. – Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does α -tocopherol. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**, 1646-1650, 1991.
- STOCKER, R.; FREI, B. – Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. **Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants**. H. Sies. London, Academic Press, 1991.

- STREHLER, B.L. – Genetic instability as the primary cause of human aging. **Exp. Gerontol.**, **21**: 283-319, 1986.
- SUARNA, C.; HOOD, R. L.; DEAN, R. T. & STOCKER, R. – Comparative antioxidant activity of tocotrienols and other natural lipid-soluble antioxidants in a homogeneous system, and in rat and human lipoproteins. **Biochim. Biophys. Acta** **1166**, 163-170, 1993.
- TAKUR, M. L.; SRIVASTAVA, U. S. – Vitamin E metabolism and its application. **Nutr. Res.** **16**: 1767-1809, 1996.
- THOMAS, T. N.; PRIEST, D. G.; ZEMP, J. W. – Distribution of superoxide dismutase in rat brain. **J. Neurochem.** **27**(1): 309-310, 1976.
- THOMAS, E. L.; LEARN, D. B. – Myeloperoxidase-catalysed oxidation of chloride and others halides: the role of chloramines, in Enverse J.; Everse K. E.; Grisham M. B. eds. – **Peroxidases in chemistry and biology.** , boca Raton, FL., CRC, p. 83, 1991.
- THOMAS, S. M.; DeMARCO, M.; D'ARCANGELO, G.; HALEGOUA, S.; BRUGGE, S. – Ras is essencial for nerve growth factor-and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. **Cell** **68**: 1031-40, 1992.
- THORNBERRY, N.A. and LAZEBNIK, Y. – Caspases: Enemies Within. **Science**, **v. 281**, p. 1312, 1998.
- TOKUNAGA, K.; KANNO, K.; OCHI, M.; NISHIMIYA, T.; SHISHINO, K.; MURASE, M.; MAKINO, H; TOKUI, S. – Lipid peroxide and antioxidants in the elderly. **Rinsho Byori**, **46**(8): 783-789, 1998.
- TOLONEN, M.; HALME, M.; SARNA, S. – Vitamin E and selenium supplementation in geriatrics patients. **Biol. Trace Elem. Res.**, **7**: 161-168, 1985.

- TOLONEN, M.; SARNA, S.; HALME, M. – Antioxidant supplementation decreases TBA reactants in serum of elderly. **Biol. Trace Elem. Res.**, **7**: 221-228, 1988.
- TONIOLO NETO, J. – **Avaliação multidimensional do indivíduo idoso: um gerenciamento informatizado**. São Paulo, 1993. (Tese – Mestrado – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina).
- TRABER, M. G.; OLIVECRONA, T.; KAYDEN, H. J. – Bovine milk lipoprotein lipase transfers tocopherol to human fibroblasts during triglycerides hydrolysis in vitro. **J. Clin. Invest.** **75**: 1729-34, 1985.
- TRABER, M. G.; SOKOL, R. J.; BURTON, G. Z.; INGOLD, K. U.; PAPAS, A. M.; HUFFAKER, J. E.; KAYDEN, H. J. – Impaired ability of patients with familial isolated vitamin E deficiency to incorporate α -tocopherol into lipoproteins secreted by the liver. **J. Clin. Invest.** **85**: 397-407, 1990.
- TRABER, M. G. – Determinants of plasma vitamin ER concentrations. **Free Rad. Biol. Med.** **16**: 229-39, 1994.
- TRICHOPOULOU, A.; LAGIOU, P.; PAPAS, A.M. – Mediterranean Diet: Are Antioxidants Central to Its Benefits?, In: **Antioxidant. Status, Diet, Nutrition, and Health**. p.107-118, 1999.
- TRUSH, M.A.; WILSON, M.E.; VAN DIKE, K. – The generation of chemiluminescence (CL) by phagocytic cells. **Methods in Enzymology**, **57**: 462-92, 1978.
- TURRENS, J. F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A. L. – Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, **237**(2): 408-414, 1985.

- TURRENS, J.F.; BOVERIS, A. – Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem. J.**, **191**: 421-427, 1980.
- URANO, S.; INOMORI, Y.; SUGAWARA, T.; KATO, Y.; KITAHARA, M.; HASEGAWA, Y.; MITSUO, M.; MUKAI, K. – Vitamin E: inhibition of retinol-induced hemolysis and membrane-stabilizing behavior. **J. Biol. Chem.** **267**(26): 18365-18370, 1992.
- VANDERJAGT, D. J.; GARRY, P. J.; BHAGAVAN, H. N.; Ascorbic acid intake and plasma levels in health elderly people. **Am. J. Clin. Nutr.**, **46**: 290-294, 1987.
- VAN DER ULJET, A.; EISERICH, J. P.; HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. – Formation of reactive nitrogen species during peroxidase- catalysed oxidation of nitrite: a potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. **J. Biol. Chem.** **272**: 7617-23, 1997.
- VANELLA, A.; VILLA, R. F.; GORINI, A.; CAMPISI, A. and GIUFFRIDA-STELLA, A. M. - Superoxide dismutase and cytochrome oxydase activities in light and heavy synaptic mitochondria from rat cerebral cortex during aging. **J. Neurosci. Res.**, **22**: 351-355, 1989.
- VAN KAMPEN, E.J. & ZIJLSTRA, W.C. – Standardization of hemoglobimetry. II. The hemoglobincyanide method. **Clin. Chim. Acta**, **6**: 538-544, 1961.
- VIDELA, L. A.; SIMIZU, K.; BARROS, S. B. M.; JUNQUEIRA, V. B. C. – Lindane-induced liver oxidative stress: respiratory alterations and the effect of desferrioxamine in the isolated perfused rat liver. **Cell Biochem. Funct** **7**: 179-183, 1989.
- VIDELA, L. A.; BARROS, S. B. M.; JUNQUEIRA, V. B. C. – Lindane-induced liver oxidative stress. **Free Rad. Biol. Med.** **9**: 169-179, 1990.

- VILLA, L. M.; E. SALAS, et al. – Peroxynitrite induces both vasodilation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **91**: 12383-12387. 1994.
- XAVIER, R. M.; YAMAUCHI, Y.; NAKAMURA, M.; TANIGAWA, Y.; ISHIKURA, H.; TSUNEMATSU, T.; & KOBAYASHI, S. – Antinuclear antibodies in healthy aging people: A prospective study. **Mech Ageing Dev** **78**, 145-154, 1995.
- WAGNER, E.S.; LINDLEY, B.; COFFIN, R.D. – High-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in urine. Effect on urinary excretion profiles after oral and intravenous administration of vitamin C. **Chromatography**, **163**: 225-229, 1979.
- WALKER, E. B.; VAN EPPS, D. E.; WARNER, N.L. – Macrophage chemiluminescence. In: HERSCOWITZ, H. B.; HOLDEN, H. T.; BELLANTI, J. A.; GHAFAR, A. eds. **Manual of macrophage methodology: collection, characterization and function**. Marcel Dekker, Inc. New York, 1981.
- WANDERS, R. J. A.; DENIS, S. – Identification of superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. **Biochem. Biophys. Acta** **1115**: 259-262, 1992.
- WARDMAN, P. and C. VON SONNTAG – Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells. **Methods Enzymol.** **251**: 31-45. 1995.
- WARNER, H. R. – Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. **Free Radic. Biol. Med.** **17**(3): 249-258, 1994.
- WARTANOWICZ, M.; PANCZENKO-KRESOWSKA, B.; ZIEMLANSKI, S.; KAWALSKA, M.; OKOLSKA, G. – The effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on the serum lipid peroxide level in elderly people. **Ann. Nutr. Metab.**, **28**: 186-191, 1984.

- WEI, Y. H.; LU, C. Y.; LEE, H. C.; PANG, C. Y.; MA, Y. S. – Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** **854**, 155-170, 1998.
- WEI, Y. H. – Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **217**, 53-63, 1998.
- WEIRICH-SCHWAIGER, H.; WEIRICH, H. G.; SCHWEIGER, M.; & HIRSCH-KAUFFMANN, M. – Correlation between senescence and DNA repair in cells from young and old individuals and in premature aging syndromes. **Mutation Res.** **316**, 37-48, 1994.
- WEITZMAN, S. A.; GORDON, L. I. – Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. **Blood** **76**: 655-663, 1990.
- WELBOURN, C. R. B.; GOLDMAN, G.; PATERSON, I. S.; VALERI, C. R.; SHEPRO, D.; HECHTMAN, H. B. – Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: Central role of the neutrophil. **Br. J. Surg.** **78**: 651-655, 1991.
- WILLIAMS, G. C. – **Evolution** **11**: 398-411, 1957.
- WILLIAMS, G. C.; NESSE, R. M. – The dawn of Darwinian medicine. **Q. Rev. Biol.** **66**: 1-22, 1991.
- WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. – Chemical biology of nitric oxide, insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Rad. Biol. Med.**, **25**(4/5): 434-456, 1998.
- WINTERBOURN, C. C.; PICHORNER, H.; KETTLE, A. J. – Myeloperoxidase-dependent generation of a tyrosine peroxide by neutrophils. **Arch. Biochem. Biophys.** **338**: 15-21, 1997.

- WOLCOTT, R. G.; FRANKS, B. S.; HANNUM, D. M.; HURST, J. K. – Bactericidal potency of hydroxyl radical in physiological environments. **J. Biol. Chem.** **269**: 9721-7, 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Health of the elderly**. Report of WHO Expert Committee. Geneva, (technical report series, 779), 1989.
- YAKES, F. M.; VAN HOUTEN, B. – Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**: 514-519, 1997.
- YAGI, K. – Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. In: YAGI, K., ed. – **Lipid peroxides in biology and medicine**. New York, Academic Press Inc., 1982. p.223-242.
- YAGI, K. – Lipides peroxides, free radicals, and disease. In: YAGI, K. ed.- **Active Oxygens, Lipid Peroxides and Antioxidants**. Tokyo, Japan Sci. Soc. Press / Boca Raton, CRC Press, 1993. p.39-56.
- YAMAGUCHI, M.; SAEKI, S.; YAMANE, H.; OKAMURA, N.; ISHIBASHI, S. – Hyperphosphorylated p47-phox lost the ability to activate NADPH oxidase in guinea pig neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Com.** **216**, 203-208, 1995.
- YANO, T.; ICHIKAWA, T. – A mechanism of vitamin E-enhanced active formation in concavalin A-stimulated alveolar macrophage. **Biochem. Mol. Biol.** **31**: 291-6, 1993.
- YOSHIDA, N.; TOSHIKAZU, Y.; MANABE, H.; TERASAWA, Y.; KONDO, M.; NOGUSHI, N.; NIKI, E. – Vitamin E protects against polymorphonuclear leukocyte-dependent adhesion to endothelial cells. **J. Leukoc. Biol.** **65**: 757-63, 1999.

- YOUNG, E. A. – Nutrition, aging and the aged. **Med. Clin. North Am.**, **67**: 295-305, 1983.
- ZAR, J. H. – **Biostatistical analysis**. Prentice Hall, 3 ed. New Jersey, p. 662, 1996.
- ZIMA, T.; STIPEK, S.; TESAR, V.; NEMECEK; MECHUROVA, A. – Free Radicals in the pathogenesis of selected diseases. **Cas. Lek. Cesk.** **134**(10): 291-295, 1995.
- ZIMMERMAN, B. J.; GRANGER, D. N. – Mechanisms of reperfusion injury. **Am. J. Med. Sci.** **307**: 284-292, 1994.
- ZU, Y.; AI, Y.; GILCHRIST, A.; LABADIA, M. E.; SHA'AFI, R. I.; HUANG, C. – Activation of MAP kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils after phorbol ester or fMLP peptide stimulation. **Blood** **87**: 5287-96, 1996.

ANEXOS

Anexo I – Carta da Comissão de Ética

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comissão de Ética Médica
Hospital São Paulo/Universidade Federal de São Paulo

São Paulo, 08 de setembro de 1997

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Luiz Roberto Ramos
Chefe do Setor de Geriatria e Gerontologia
Departamento de Medicina da UNIFESP-EPM

Senhor Professor,

A Comissão de Ética Médica do Hospital São Paulo/Universidade Federal de São Paulo analisou e aprovou o projeto de pesquisa intitulado: "Estresse oxidativo e envelhecimento"

Atenciosamente,

Prof. Dr. Marcos de Almeida
Secretário da Comissão de Ética Médica do
Hospital São Paulo/Universidade Federal de São Paulo

cc.: Prof. Dr. Nestor Schor
Chefe do Departamento de Medicina da UNIFESP-EPM

Rua Pedro de Toledo, 947 - CEP 04039-032 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 576.4368 - FAX (011) 549.2127

Anexo II – Avaliação Clínica**SISTEMA GERIATRIA
2. OBSERVAÇÃO CLÍNICA**

RGger: _____ RGhosp: _____ Data: ____/____/____

Nome: _____ Idade: _____

2.1. HISTÓRIA:**a. HPMA:**

b. MEDICAÇÃO

2.2. INTERROGATÓRIO**a. GERAL:**

- (s) (n) Febre
- (s) (n) Anorexia
- (s) (n) Emagrecimento

b. ALTERAÇÃO VISUAL

- (s) (n) Uso de óculos
- [1] com melhora
- [2] sem melhora

c. ALTERAÇÃO AUDITIVA

- (s) (n) Uso do aparelho
- [1] com melhora
- [2] sem melhora
- (s) (n) Diminuição de acuidade
- [1] discreta
- [2] limitante

d. ALTERAÇÃO NA BOCA

- (s) (n) Dificuldade de mastigação
- (s) (n) Problema de deglutição
- (s) (n) Uso de prótese

e. ALTERAÇÃO CARDIO-RESPIRATÓRIA

- (s) (n) Dor pre-cordial
- [1] Repouso [2] Esforço
- (s) (n) Dispnéia
- [1] Repouso [3] Esforço
- [2] Decubito
- (s) (n) Palpitação
- (s) (n) Tosse
- (s) (n) Chiado

f. ALTERAÇÃO GASTRO-INTESTINAL

- (s) (n) Dor abdominal
- (s) (n) Dispepsia
- (s) (n) Intolerância alimentar
- (s) (n) Alteração de hábito intestinal
- [1] Diarréia [2] Obstipação

g. ALTERAÇÃO GENITO-URINÁRIA

- (s) (n) Disúria
- (s) (n) Nictúria
- (s) (n) Poliúria
- (s) (n) Polaciúria
- (s) (n) Urgência
- (s) (n) Incontinência
- (s) (n) Sangramento
- (s) (n) Prostatismo

h. ALTERAÇÃO NEURO-PSIQUÍCA

- (s) (n) Dor de cabeça
 (s) (n) Tontura
 () Rotatória
 () Desequilíbrio
 () Escurecimento de visão
 (s) (n) Tremor
 () Repouso
 () Ação
 (s) (n) Alteração da marcha
 (s) (n) Irritabilidade
 (s) (n) Agitação Psicomotora
 (s) (n) Agressividade
 (s) (n) Distúrbio do sono
 (s) (n) Depressão
 (s) (n) Distúrbio Memória

j. OBS.:

i. ALTERAÇÃO MÚSCULO-ESQUELÉTICA

- (s) (n) Dor articular
 [] discreta [] limitante
 (s) (n) Deambulação
 (s) (n) Claudicação
 (s) (n) Mialgia

2.3. ANTECEDENTES

a. PESSOAS

- (s) (n) Diabetes Mellitus
 (s) (n) Hipertensão Arterial
 (s) (n) AVC
 (s) (n) Cardiopatia
 (s) (n) Infecções Pulmonares
 (s) (n) Infecções Urinárias
 (s) (n) Tabagismo
 (s) (n) Etilismo

b. FAMILIARES

- (s) (n) Diabetes Mellitus
 (s) (n) Hipertensão Arterial
 (s) (n) Cardiopatia
 (s) (n) AVC
 (s) (n) Quadros demenciais
 (s) (n) Quadros psiquiátricos
 (s) (n) Neoplasias

Fraturas

- () Fêmur
 () Bacia
 () Membro superior
 () Membro inferior
 () Vértebra
 [] Número de filhos (tidos)
 [] Número de quedas (último ano)
 (s) (n) Cirúrgias

c. OBS.:

a. GERAL:

Peso: kg
 Altura: metro
 P.A. deitado: mmHg
 P.A. sentado: mmHg
 F.R.: bpm
 Pulso: bpm

(s) (n) Arritmico

(s) (n) Alt. estado geral

(s) (n) Desidratado

(s) (n) Descorado

(s) (n) Ganglios

(s) (n) Alt. de pele

(s) (n) Escaras

(s) (n) Úlceras MMII

(s) (n) Déficit auditivo

(s) (n) Déficit visual

b. ALT. DE TIREÓIDE

(s) (n) Nódulos

(s) (n) Difuso

c. ALT. CARDÍACA

(s) (n) Sopros

(s) (n) Arritmia

d. ALT. PULMONAR

(s) (n) Alt. m. vesicular

(s) (n) Estertores

(s) (n) Roncos / Sibilos

j. OBS.:

s (sim)

n (não)

e. ALT. DE PULSOS

	D	E
Carotideo:	[]	[]
Radial:	[]	[]
Femoral:	[]	[]
Popliteo:	[]	[]
Tibial p:	[]	[]
Pedioso:	[]	[]

f. ALT. ABDOMINAL

(s) (n) Fígado
 (s) (n) Baço
 (s) (n) Tumorações
 (s) (n) Hernias
 (s) (n) Aorta abdominal
 (s) (n) Dor

g. ALT. EXTREMIDADES

(s) (n) Edema de MMII
 (s) (n) Perf. periférica
 (s) (n) Ausência de membro
 (s) (n) Varizes

h. ALT. NEUROLÓGICO

(s) (n) Marcha
 (s) (n) Equilíbrio
 (s) (n) Reflexos
 (s) (n) Paresias
 (s) (n) Paralisias
 (s) (n) Orientação

i. EXAME F.O.

A [] B []

2.5. HIPÓTESES DIAGNÓSTICAS

2.6. EXAMES LABORATORIAS

2.7. PROGRAMAÇÃO

**CENTRO DE ESTUDOS DO ENVELHECIMENTO
SETOR DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
HOSPITAL SÃO PAULO**

ATIVIDADES DIÁRIAS

Agora eu gostaria de perguntar sobre algumas atividades e tarefas do seu dia a dia. Estamos interessados em saber se o(a) sr(a) consegue fazer estas atividades sem nenhuma necessidade de auxílio ou se precisa de alguma ajuda, ou se não consegue fazer tais atividades de forma nenhuma.

	SEM DIFIC.	COM DIFICULDADE		NS	NR	QUEM AJUDA	MORA JUNTO
		POUCA	MUITA				
A - Deitar / Levantar – cama	(1)	(2)	(3)	(9)	(0)	a)	()
B - Comer	(1)	(2)	(3)	(9)	(0)	b)	()
C - Pentear cabelo	(1)	(2)	(3)	(9)	(0)	c)	()
D - Andar no plano	(1)	(2)	(3)	(9)	(0)	d)	()
E - Tomar banho	(1)	(2)	(3)	(9)	(0)	e)	()
F - Vestir-se	(1)	(2)	(3)	(9)	(0)	f)	()
G - Ir ao banheiro em tempo	(1)	(2)	(3)	(9)	(0)	g)	()
H - Subir escada (1 lance)	(1)	(2)	(3)	(9)	(0)	h)	()
I - Medicar-se na hora	(1)	(2)	(3)	(9)	(0)	i)	()
J - Andar perto de casa	(1)	(2)	(3)	(9)	(0)	j)	()
K - Fazer compras	(1)	(2)	(3)	(9)	(0)	k)	()
L - Preparar refeições	(1)	(2)	(3)	(9)	(0)	l)	()
M - Cortar unhas dos pés	(1)	(2)	(3)	(9)	(0)	m)	()
N - Sair de condução	(1)	(2)	(3)	(9)	(0)	n)	()
O - Fazer limpeza	(1)	(2)	(3)	(9)	(0)	o)	()

Obs.: Códigos de parentesco

1	Pai, mãe, sogro(a), tio(a)
2	Conjuge
3	Irmãos, primos, cunhados
4	Filhos, enteados
5	Genro, nora
6	Netos
7	Bisnetos
10	Amigo, conhecido
11	Outros
8	NA
9	NS
0	NR

Anexo III – Avaliação Nutricional

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA – DISCIPLINA DE NUTRIÇÃO

Nome: _____ RG: _____ Data: _____
 Peso: _____ Estatura: _____ IMC: _____

Alimento	Nunca/ Raramente	1/mês	2/mês	1/sem	2-4/sem	> 4/sem	1/dia	+1/dia	Quantidade
Carne de boi/vaca									
Frango									
Porco									
Fígado									
Ovo									
Leito tipo ^a									
Queijo									
Abóbora									
Cenoura									
Couve									
Escarola									
Agrião/rúcula									
Laranja									
Mexicana									
Mamão									
Limonada									
Suco de laranja ^b /laranjada									

a - Quantidade exata, sem café

b - Suco puro

BIBLIOTECA
 INSTITUTO DE QUÍMICA
 Universidade de São Paulo

Modo de preparo do suco de laranja e limão (tempo de preparo e consumo/armazenamento;
quantidade de água):

Qual é o tipo de óleo ou gordura (animal, margarina) que é utilizado para o preparo de seus alimentos ?

Você está tomando alguma vitamina ? _____

Qual ? _____ Quantidade : _____