



**BETÂNIA DE JESUS E SILVA DE ALMENDRA FREITAS**

**POSSÍVEIS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO  
PARA CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA:  
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA C, E E  
MINERAL ZINCO EM INDIVÍDUOS QUE TIVERAM  
CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA**

**CAMPINAS  
2014**





---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

BETÂNIA DE JESUS E SILVA DE ALMENDRA FREITAS

**POSSÍVEIS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO  
PARA CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA:  
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA C, E E  
MINERAL ZINCO EM INDIVÍDUOS QUE TIVERAM  
CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. PATRICIA MORIEL**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas, Área de concentração Ciências Biomédicas.

*ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA  
ALUNA BETÂNIA DE JESUS E SILVA DE  
ALMENDRA FREITAS E ORIENTADA PELA  
PROFA. DRA. PATRÍCIA MORIEL.*

---

*Assinatura do Orientador*

**CAMPINAS  
2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

F884p Freitas, Betânia de Jesus e Silva de Almendra, 1962-  
Possíveis marcadores de estresse oxidativo para câncer de pele não melanoma : efeito da suplementação de vitamina C, E e mineral zinco em indivíduos que tiveram câncer de pele não melanoma / Betânia de Jesus e Silva de Almendra Freitas. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Patrícia Moriel.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias cutâneas. 2. Estresse oxidativo. 3. F2-isoprostanos. 4. Suplementos dietéticos. 5. Antioxidantes. 6. Biomarcadores. I. Moriel, Patrícia, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Possibles markers of oxidative stress for non- melanoma skin câncer : effect of supplementation of vitamin C,E e zinc in individuals who had non-melanoma skin cancer

**Palavras-chave em inglês:**

Skin neoplasms  
Oxidative stress  
F2-Isoprostanes  
Dietary supplements  
Antioxidants  
Biomarkers

**Área de concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Doutora em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Patrícia Moriel [Orientador]  
Ilma Kruze Grande de Arruda  
Diogo Pilger  
Carmen Sílvia Passos Lima  
Priscila Gava Mazzola

**Data de defesa:** 18-07-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

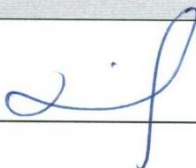
**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

**BETÂNIA DE JESUS E SILVA DE ALMENDRA FREITAS**

Orientador (a) PROF(A). DR(A). PATRICIA MORIEL

**MEMBROS:**

1. PROF(A). DR(A). PATRICIA MORIEL



2. PROF(A). DR(A). ILMA KRUIZE GRANDE DE ARRUDA



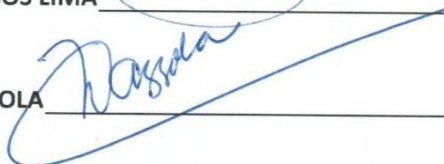
3. PROF(A). DR(A). DIOGO PILGER



4. PROF(A). DR(A). CARMEN SILVIA PASSOS LIMA



5. PROF(A). DR(A). PRISCILA GAVA MAZZOLA



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 18 de julho de 2014



*A meus filhos, Danilo, Leonardo e Natália, minha fonte inesgotável de admiração, orgulho e gratidão a Deus, pelo apoio e colaboração necessários na superação dos obstáculos.*





## AGRADECIMENTOS

---

*A Deus, pela força, coragem e serenidade para concluir essa etapa de minha vida.*

*À Professora Doutora Patrícia Moriel pela orientação segura, pela disponibilidade, pelo incentivo e, principalmente, por partilhar a sua experiência.*

*À Professora Doutora Dilina do Nascimento Marreiro pela confiança e incentivo que tanto me ajudaram na realização deste trabalho.*

*À Professora Doutora Heloisa Blota e ao Professor Doutor Viriato Campêlo pelo empenho e garra na coordenação e acompanhamento incentivador do Doutorado Interinstitucional em Ciências Médicas junto a UNICAMP e UFPI respectivamente.*

*A Mestranda Bruna Taliani Tuan pela disponibilidade e profissionalismo na condução das análises dos marcadores de estresse oxidativo*

*Ao mestrando Gustavo Rafaini Lloret e a doutoranda Marília Berlofa Visacri pela valiosa colaboração*

*Aos Professores do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Piauí, por sua amizade, por seu carinho e pelo companheirismo ao longo de todos esses anos.*

*Ao Professor Jose Machado Moita Filho pelas valiosas contribuições estatísticas.*

*As pessoas que se incorporaram ao grupo pesquisado, que doaram um pouco de seu tempo e seu sangue para que este estudo pudesse ser desenvolvido.*

*À UFPI e à Faculdade de Ciências Médicas, pela infraestrutura laboratorial necessária às análises.*

*Aos professores Dra. Ilma Kruze Grande de Arruda, Dr. Diogo Pilger, Dra. Carmen Sílvia Passos Lima e Dra. Priscila Gava Mazzola na qualidade de integrantes da banca de defesa do doutorado pelas valiosas contribuições*



## ***Se por um instante...***

*Se por um instante, Deus se esquecesse de que sou uma marionete de trapo e me oferecesse mais um pouco de vida, não diria tudo o que penso, mas pensaria tudo o que digo.*

*Daria valor às coisas, não pelo que valem, mas pelo que significam.*

*Dormiria pouco, sonharia mais, porque entendo que por cada minuto que fechamos os olhos perdemos sessenta segundos de luz. Andaria quando os outros param, acordaria quando os outros dormem. Ouviria quando os outros falam e como desfrutaria um bom gelado de chocolate!*

*Se Deus me oferecesse um pouco de vida, vestir-me-ia de forma simples, deixando a descoberto não apenas o meu corpo, mas também a minha alma.*

*Meu Deus, se eu tivesse um coração, escreveria o meu ódio sobre o gelo e esperava que nascesse o sol.*

*Pintaria com um sonho de Van Gogh sobre as estrelas de um poema de Benedetti e uma canção de Serrat seria a serenata que eu ofereceria à Lua!*

*Regaria as rosas com as minhas lágrimas para sentir a dor dos seus espinhos e o beijo encarnado das suas pétalas...*

*Meu Deus, se eu tivesse um pouco de vida... não deixaria passar um só instante sem dizer às pessoas de quem gosto que gosto delas.*

*Convenceria cada mulher ou homem que é o meu favorito e viveria apaixonado pelo amor. Aos homens provar-lhes-ia como estão equivocados ao pensar que deixam de se apaixonar quando envelhecem, sem saberem que envelhecem quando deixam de se apaixonar!*

*A uma criança, dar-lhe-ia asas, mas teria de aprender a voar sozinha.*

*Aos velhos ensinar-lhes-ia que a morte não chega com a velhice, mas com o esquecimento.*

*Aprendi que um homem só tem direito a olhar outro de cima para baixo  
quando vai ajudá-lo a levantar-se...*

*Tantas foram as coisas que aprendi com vocês, os homens!*

*Aprendi que todo o mundo quer viver em cima da montanha, sem saber  
que a verdadeira felicidade está em subir a encosta...*

*Aprendi que, quando um recém-nascido aperta, com a sua pequena mão,  
pela primeira vez, o dedo de seu pai, tem agarrado para sempre.*

*São tantas as coisas que pude aprender com vocês, mas não me irão servir  
realmente de muito, porque, quando me guardarem dentro dessa maleta,  
infelizmente, estarei a morrer...*

**(Gabriel García Márquez)**

Estudos acerca da influência do estresse oxidativo sobre o equilíbrio cutâneo, sobretudo por seus efeitos devastadores sobre a integridade da pele, são essenciais para a proposição de estratégias de intervenção preventivas para o desenvolvimento do câncer de pele. O objetivo do estudo foi comparar o estresse oxidativo de indivíduos que tiveram e não tiveram câncer de pele não melanoma e avaliar o efeito da suplementação combinada de vitaminas C, E e mineral Zinco no estresse oxidativo de indivíduos que apresentaram a doença. O estudo foi dividido em duas fases: a fase 1 foi estudo transversal com controles, cuja população foi constituída por pessoas saudáveis (n = 24) e o grupo casos constituído por indivíduos que apresentaram câncer de pele não melanoma já submetidas a tratamento cirúrgico (n = 60). E a fase 2 um ensaio clínico randomizado e duplo cego onde os pacientes do grupo caso foram randomizados em dois subgrupos: grupo placebo (n = 34) e grupo suplementado (n = 26) com 50 mg de vitamina C, 60 mg de vitamina E e 40 mg de Zinco durante 8 semanas. As amostras de sangue dos sujeitos foram obtidas no período basal e após intervenção para a avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo (F2-isoprostano, nitrito, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e capacidade antioxidante total). O consumo alimentar habitual e o estado nutricional dos sujeitos foram avaliados. Para identificação dos fatores associados ao câncer de pele foi utilizada a análise de regressão logística univariada e multivariada. O nível de significância adotado para este estudo foi de 5%. A maioria dos pacientes estudados foram do sexo feminino com idade superior a 50 anos. Os pacientes do grupo caso apresentaram mais elevadas concentrações séricas dos biomarcadores de estresse oxidativo, sendo que as concentrações de F2-isoprostano estavam significativamente mais elevadas em comparação com os controles. Após suplementação não existiu diferença estatística entre os grupos placebo e suplementado em relação aos marcadores de estresse oxidativo. A idade e o F2-isoprostano podem ser marcadores de risco para o câncer de pele não melanoma, a cada ano a mais para o fator idade aumenta em 12% a chance de câncer e cada

unidade a mais na medida do marcador aumenta em 4% a chance de câncer. Os resultados mostraram prevalência de sobrepeso no grupo controle com diferença estatística significativa em relação ao grupo caso. As concentrações dietéticas dos minerais antioxidantes zinco, cobre e selênio do grupo caso foram estatisticamente inferiores em relação aos controles e não houve diferença estatística nas concentrações dietéticas dos nutrientes antioxidantes entre os grupos suplementado e placebo. Este estudo sugere que pessoas diagnosticadas com câncer de pele não melanoma e que no momento da realização da pesquisa não mais apresentavam a doença, mostravam elevado estresse oxidativo, quando comparadas a pessoas saudáveis. A suplementação de antioxidantes pelo período de tempo realizado no trabalho não provocou redução significativa nas concentrações dos marcadores de estresse oxidativo dos pacientes. O estudo ainda sugere que o marcador de estresse oxidativo F2-isoprostano pode ser utilizado como um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pele não melanoma.

**Palavras-chave:** Neoplasias cutâneas; Estresse oxidativo; F2-isoprostanos; Suplementos dietéticos; Antioxidantes; Biomarcadores.

Studies investigating the influence of oxidative stress on skin homeostasis, especially for its devastating effects on skin integrity, are essential for the development of preventive intervention strategies for skin cancer. The goal of this study was to compare the concentrations of oxidative stress biomarkers in blood between individuals with and without non-melanoma skin cancer and evaluate the effect of combined supplementation with vitamins C, E, and the mineral zinc on oxidative stress in patients who had non-melanoma skin cancer. The study was divided into two stages: stage 1 was cross-sectional study with controls, whose population consisted of healthy subjects (n = 24) and the case group included subjects who had non-melanoma skin cancer no longer undergoing surgery (n = 60). The phase 2 a randomized, double blind clinical trial where patients in the case group were randomized into two groups: placebo (n = 34) and supplemented group (n = 26) with 50 mg of vitamin C, 60 mg vitamin E and 40 mg zinc for 8 weeks. Blood samples were taken from the subjects before and after intervention to evaluate levels of oxidative stress biomarkers (F2-isoprostane, nitrite, thiobarbituric acid reactive substances [TBARS]) and total antioxidant capacity). The usual food consumption and nutritional state of the subjects were also evaluated. Multivariate and univariate logistics regression analysis were used to identify factors associated with the development of skin cancer. The level of significance adopted for this study was 5%. The majority of participants were women over the age of 50. The patients in the case group had higher serum concentrations of oxidative stress biomarkers, and the levels of F2-isoprostane were significantly higher than the controls. After antioxidant supplementation there was no statistical difference in the markers of oxidative stress among the placebo and supplemented groups. Age and F2-isoprostane may be effective biomarkers for estimating the risk of non-melanoma skin cancer development. Moreover, the risk of cancer increases with age at a rate of 12% per year, while an increase in concentration of these biomarker in blood increases the risk of cancer by 4%.

These results showed a prevalence of excess weight in the control group with significant statistical difference from the case group. The dietary intake of the mineral antioxidants zinc, copper, and selenium of the case group were significantly lower than the control group, and there was no statistical difference in the dietary intake of the antioxidant nutrients among the supplemented and placebo groups. This study suggests that people diagnosed with non-melanoma skin cancer and those in remission at the time of the study, exhibited higher levels oxidative stress than healthy individuals. The antioxidant supplementation by period the work performed did not cause significant reduction in serum concentrations of oxidative stress biomarkers of the patients. The results suggest that the concentration of the oxidative stress biomarker, F2-isoprostane, may serve as risk factor for non-melanoma skin cancer development.

**Key-words:** Skin neoplasms; Oxidative stress; F2-Isoprostanes; Dietary supplements; Antioxidants; Biomarkers.



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>HOO<sup>-</sup></b>	- Hidroperoxil
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	- Oxigênio singlete
<b>8-iso-PGF2<math>\alpha</math></b>	- isoprostano
<b>8-OHdG</b>	- 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
<b>ABTS2</b>	- 2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonete
<b>AP 1</b>	- Proteína ativadora 1
<b>ATP</b>	- Adenosina Trifosfato
<b>CAOT</b>	- Capacidade antioxidante total
<b>CAPNM</b>	- Câncer de pele não melanoma
<b>CAT</b>	- Catalase
<b>CBC</b>	- Carcinoma Basocelular
<b>CDKN2A, CDK4</b>	- Genes mutantes
<b>CEC</b>	- Carcinoma Espinocelular
<b>Cfos</b>	- fator de transcrição proto-oncogene
<b>CG-EM</b>	- Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa
<b>Cjun</b>	- Proteína jun gene
<b>CLAE</b>	- Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>COX-2</b>	- Ciclooxygenase
<b>CPD</b>	- Dímeros de ciclobutano de pirimidina
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	- Ion Cúprico
<b>CuZn-SOD</b>	- Cobre- Zinco Superóxido dismutase
<b>DNA</b>	- Ácido desoxirribonucléico
<b>DOPA</b>	- 3,4-diidroxifenilalanina
<b>DTNB</b>	- 2,4-dinitrofenil-hidrazina
<b>EDTA</b>	- Ácido etileno diamino tetracético
<b>ELISA</b>	- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>ERK</b>	- Quinase reguladora extracelular
<b>ERNs</b>	- Espécies Reativas de Nitrogênio
<b>EROs</b>	- Espécies Reativas de Oxigênio
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	- Ferro Férrico
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	- Ferro Férrico
<b>FNT<math>\alpha</math></b>	- Fator de Necrose Tumoral

<b>FOX</b>	- Fe <sup>+3</sup> orange xlenol
<b>G6DP</b>	- Glicose-6-fosfato
<b>Gene p53</b>	- gene p53 do DNA
<b>GPx</b>	- Glutaciona peroxidase
<b>GPX<sub>1</sub></b>	- Glutaciona peroxidase oxidoreductora extra celular
<b>GPX<sub>2</sub></b>	- Glutaciona gastrointestinal
<b>GPX<sub>3</sub></b>	- Glutaciona presente no plasma
<b>GPX<sub>4</sub></b>	- Glutaciona hidroperóxido fosfolípido
<b>GSH</b>	- Glutaciona reduzida
<b>GSSG</b>	- Glutaciona oxidase
<b>H</b>	- Hidrogênio
<b>H<sub>2</sub>O</b>	- Água
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	- Peróxido de hidrogênio
<b>HGV</b>	- Hospital Getúlio Vargas
<b>HO<sub>2</sub></b>	- Hidroperoxila
<b>HOCl</b>	- Ácido hipocloroso
<b>hOGG1</b>	- 8 oxoguanine DNA-glicosilase 1 desidrogenase
<b>HPLC</b>	- Cromatografia líquida de alta pressão
<b>IKK</b>	- Inibitória Kappa quinase
<b>IL-10</b>	- Interleucina 10
<b>IL1<math>\alpha</math></b>	- Interleucina 1 alfa
<b>IL-6</b>	- Interleucina 6
<b>IL-8</b>	- Interleucina 8
<b>INCA</b>	- Instituto Nacional do Câncer
<b>iNOS</b>	- Óxido nítrico sintetase citocina induzida
<b>IOM</b>	- Institute of Medicine
<b>JNK</b>	- c-jun N-terminal quinase
<b>L<sup>•</sup></b>	- Radical lipídico
<b>LDL</b>	- Lipoproteínas de baixa densidade
<b>LO</b>	- Alcoxila
<b>LO<sub>2</sub></b>	- Peroxila
<b>LOOH</b>	- Hidroperóxido de lipídio
<b>MAPK</b>	- Proteína quinase mitógeno-ativada
<b>MDA</b>	- Malondialdeído
<b>MEK1 e MEK2</b>	- Intermediárias da cascada de produção da proteína quinase mitógeno-ativada

<b>MMP 1</b>	- Metaloproteinase da matriz 1
<b>MMP 3</b>	- Metaloproteinase da matriz 3
<b>MMP 9</b>	- Metaloproteinase da matriz 9
<b>NADH</b>	- Nicotinamina adenina dinucleotideo desidrogenase
<b>NADP</b>	- Nicotinamina adenina dinucleotideo fosfato
<b>NADPH</b>	- Nicotinamina adenina dinucleotideo fosfato reduzida
<b>NIK</b>	- N terminal quinase inibitória
<b>NO<sup>•</sup></b>	- Óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub></b>	- Dióxido de Nitrogênio
<b>NOS</b>	- Óxido nítrico sintetase
<b>O<sub>2</sub></b>	- Oxigênio
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	- Ânion Radical superóxido
<b>O<sub>3</sub></b>	- Ozônio
<b>OH<sup>•</sup></b>	- Hidroxila
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	- Ânion peroxinitrito
<b>p38MAPK</b>	- p38 proteína quinase mitógeno-ativada
<b>PL</b>	- Peroxidação lipídica
<b>PTCH</b>	- gene patched
<b>PUFA</b>	- Ácidos graxos polinsaturados
<b>RIA</b>	- Radioimmunoassays
<b>RNA</b>	- Ácido ribonucléico
<b>RNA</b>	- Ácido ribonucléico mensageiro
<b>RUV</b>	- Radiações ultravioletas
<b>RUV B</b>	- Radiações ultravioletas B
<b>SBD</b>	- Sociedade Brasileira de Dermatologia
<b>Se GPx</b>	- Selênio Glutathiona Peroxidase
<b>SK</b>	- Queratose solar
<b>SNC</b>	- Sistema Nervoso Central
<b>SOD</b>	- Superóxido dismutase
<b>TAS</b>	- Total Antioxidant Status
<b>TEAC</b>	- Trolox Equivalent Antioxidant Capacity



## LISTA DE QUADROS

---

<b>Quadro 1.</b> Espécies Reativas de Oxigênio. ....	44
<b>Quadro 2.</b> Doses e marcas utilizadas dos suplementos de Zinco, Vitamina E e Vitamina C.....	97
<b>Quadro 3.</b> Procedimento de determinação de nitrito nas amostras e na curva padrão. ....	99



## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Estado nutricional segundo % circunferência do braço (CB), % prega cutânea tricipital (PCT) e % circunferência muscular do braço (CMB).....	103
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros para avaliação do estado nutricional pelo Índice de massa corporal (IMC) para a faixa etária inferior a 60 anos.....	104
<b>Tabela 3.</b> Valores Referentes à DRI/ EAR (necessidade média estimada) para os Nutrientes Antioxidantes.....	107
<b>Tabela 4.</b> Características sócio demográficas e hábitos de vida dos grupos caso e controle. ....	112
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros antropométricos segundo os grupos controle e caso. ....	116
<b>Tabela 6.</b> Avaliação do estado nutricional a partir do índice de massa corporal (IMC), Prega cutânea tricipital (PCT), Circunferência do braço (CB), Circunferência muscular do braço (CMB) dos grupos controle e caso.....	117
<b>Tabela 7.</b> Frequência de consumo alimentar semanal por alimento dos grupos controle e caso. ....	118
<b>Tabela 8.</b> Concentrações dietéticas médias e desvios padrão do consumo de nutrientes antioxidantes na dieta habitual do grupo controle e grupo caso.....	119
<b>Tabela 9.</b> Análise da correlação linear simples entre os parâmetros de estresse oxidativo e concentrações dietéticas de nutrientes antioxidantes do grupo controle. ....	120
<b>Tabela 10.</b> Análise da correlação linear simples entre os parâmetros de estresse oxidativo e as concentrações dietéticas de nutrientes antioxidantes do grupo caso.....	121
<b>Tabela 11.</b> Análise de regressão logística para os fatores associados ao risco do desenvolvimento de câncer de pele não-melanoma. ....	122
<b>Tabela 12.</b> Características sócio demográficas e hábitos de vida dos grupos placebo e suplementado. ....	124

<b>Tabela 13.</b> Parâmetros antropométricos segundo os grupos placebo e suplementado.....	129
<b>Tabela 14.</b> Avaliação do estado nutricional a partir do índice de massa corporal (IMC), Prega cutânea tricipital (PCT), Circunferência do braço (CB), Circunferência muscular do braço (CMB) dos grupos placebo e suplementado.....	130
<b>Tabela 15.</b> Concentrações dietéticas médias e desvios padrão do consumo de nutrientes antioxidantes na dieta habitual do grupo placebo e suplementado.....	131



## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Antioxidantes e locais de ação..	34
<b>Figura 2.</b> Esquema do Processo de Peroxidação Lipídica..	49
<b>Figura 3.</b> Sistemas de Defesa Antioxidante Enzimático..	56
<b>Figura 4.</b> Ação da RUV sobre a pele..	81
<b>Figura 5.</b> Desenho dos estudos realizados neste trabalho..	93
<b>Figura 6.</b> Esquema de Desenvolvimento do Processo de Análise do Isoprostano.....	101
<b>Figura 7.</b> Capacidade Antioxidante Total dos grupos controle (n = 24) e grupo caso (n = 60)..	113
<b>Figura 8.</b> Concentração plasmática de Nitrito do grupo controle (n= 24) e grupo caso (n = 60)..	114
<b>Figura 9.</b> Concentração plasmática das Espécies Reativas de Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) do grupo controle (n = 24) e grupo caso (n = 60)..	114
<b>Figura 10.</b> Concentração plasmática de F2-isoprostanos do grupo controle (n = 24)..	115
<b>Figura 11.</b> Organograma de caracterização do estudo (Fase 2)..	123
<b>Figura 12.</b> Capacidade Antioxidante Total dos grupos placebo (n = 34) e suplementado (n = 26) no período basal e após suplementação. Legenda:.....	125
<b>Figura 13.</b> Concentração plasmática de Nitrito dos grupos placebo (n = 34) e suplementado (n = 26) no período basal e após suplementação.....	126
<b>Figura 14.</b> Concentração plasmática das Espécies Reativas de Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) dos grupos placebo (n = 34) e suplementado (n = 26) no período basal e após suplementação.....	127
<b>Figura 15.</b> Concentração plasmática de F2-isoprostanos dos grupos controle (n = 24) e grupos placebo (n = 34) e suplementado (n = 26) no período basal e após suplementação..	128



# SUMÁRIO

---

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
LISTA DE QUADROS .....	xxi
LISTA DE TABELAS .....	xxiii
LISTA DE FIGURAS .....	xxv
1. INTRODUÇÃO .....	29
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	37
2.1. Epidemiologia do Câncer de Pele.....	39
2.2. Câncer de Pele Melanoma .....	40
2.3. Câncer de Pele não Melanoma.....	41
2.3.1. Diagnose e Tratamento .....	43
2.4 Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio .....	44
2.4.1 Produção de ROS (Radicais livres de oxigênio) e RNS (Radicais livres de nitrogênio).....	45
2.4.2. Toxicidade das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio .....	48
2.4.3. Não Radicais .....	52
2.5. Estresse Oxidativo e Sistema de Defesa Antioxidante.....	53
2.6 Vitaminas Antioxidantes.....	59
2.7 Zinco e Outros Minerais Antioxidantes .....	64
2.8 Biomarcadores do Estresse Oxidativo .....	68
2.9 Estresse Oxidativo e Câncer .....	76
2.9.1 Estresse Oxidativo e Câncer de Pele .....	77
3. OBJETIVOS .....	87
3.1 Objetivo Geral.....	89
3.2 Objetivos Específicos.....	89
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	91
4.1 População e Amostra.....	93
4.2 Randomização.....	96
4.3 Suplementação .....	96
4.4 Coleta de Material Biológico .....	97

4.5	Separação dos Componentes do Sangue .....	97
4.6	Determinações dos Parâmetros Bioquímicos .....	98
4.6.1	Dosagem de nitrito pela reação de Griess .....	98
4.6.2	Determinação da capacidade antioxidante total .....	99
4.6.3	Determinação de 8-Isoprastano livre .....	100
4.6.4	Dosagem do TBARS (Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico) .....	101
4.7	Avaliação Nutricional .....	102
4.8	Avaliação do Consumo Alimentar Habitual .....	104
4.9	Instrumento de Coleta de Dados .....	107
4.10	Análise Estatística .....	107
4.11	Aspectos Éticos .....	108
5.	RESULTADOS .....	109
5.1	Fase 1 .....	111
5.1.1	Avaliação do Estresse Oxidativo.....	113
5.1.2	Avaliação do Estado Nutricional e do consumo alimentar .....	116
5.1.3	Correlações .....	120
5.1.4	Medida de Associação .....	121
5.2	Fase 2 .....	122
5.2.1	Avaliação do Estresse Oxidativo.....	125
5.2.2	Avaliação do Estado Nutricional .....	129
6.	DISCUSSÃO .....	133
7.	CONCLUSÃO.....	169
8.	REFERÊNCIAS .....	173
	ANEXOS .....	201
	APÊNDICES.....	213

## **1. INTRODUÇÃO**





Mesmo com grandes esforços para o diagnóstico precoce e novos tratamentos, o câncer ainda apresenta alta incidência mundial. No Brasil, os tipos mais incidentes de câncer, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma (CPNM), são os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino<sup>(1)</sup>. Estima-se uma incidência mundial para o ano de 2020 de 15 milhões de novos casos, sendo que 60% destes ocorrerão em países de média e baixa renda<sup>(2)</sup>.

O CPNM representa o mais comum tipo de câncer, cerca de 182 mil novos casos para o ano de 2014 no Brasil<sup>(1)</sup>. Apresenta-se na forma de carcinoma basocelular (CBC) e carcinoma espinocelular (CEC)<sup>(1,3)</sup>, sendo o CBC a neoplasia maligna mais frequente correspondendo a 70-80% dos tumores cutâneos<sup>(1,3)</sup>.

Fatores ambientais exercem forte influência no processo tumorigênico desse câncer, razão pela qual ocorrem variações em suas incidências em diferentes localizações geográficas e em diferentes condições ecológicas e etnias<sup>(4,5)</sup>.

Há subestimativa em seus dados de prevalência, devido ao sub-registro<sup>(5)</sup>, uma vez que técnicas não excisionais de tratamento não implicam em notificação compulsória por parte dos serviços especializados; portanto, a contribuição desse tipo de câncer no contexto doença do país ultrapassa as estimativas oficiais<sup>(1,6)</sup>.

A Campanha Nacional de Prevenção de Câncer de Pele realizada em Teresina em 2011, em conjunto com a Sociedade Brasileira de Dermatologia, avaliou 406 pessoas que procuraram voluntariamente a Clínica Dermatológica de um hospital de referência nesta cidade e revelou uma incidência de câncer de Pele não melanoma em 12,3% desta população, com predominância de CBC em 77,1% dos casos e 54,0% concentravam-se no sexo feminino. Entre os sujeitos que apresentavam cor de pele branca, 61,5% apresentavam CBC e 28,1% apresentavam CEC e daqueles com cor de pele parda, 85,7% apresentavam CEC<sup>(7)</sup>.

A pele é o maior órgão do corpo e serve como importante conexão entre o ambiente e o organismo para proteger este de agentes físicos, químicos e microbiológicos agressores <sup>(8,9)</sup> que são capazes de alterar a estrutura e função da pele, por induzir à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) <sup>(8)</sup>.

Estas espécies são fundamentais para manter a sobrevivência e a homeostase celular, quando em condições de equilíbrio entre sua formação e remoção. Porém, quando há alterações acentuadas neste equilíbrio, um estado pró-oxidante é gerado, levando assim ao estresse oxidativo <sup>(8,9)</sup>.

Logo, estudos acerca da influência do estresse oxidativo sobre o equilíbrio cutâneo, sobretudo por seus efeitos devastadores sobre a integridade da pele, são essenciais para a proposição de estratégias de intervenção preventivas, com o fim de romper a cadeia multifatorial responsável por essa fragilidade. Afinal, o sucesso na prevenção do CPNM depende de uma abordagem simples e de baixo custo, incluindo proteção à exposição ao sol, educação em saúde com conscientização da necessidade de monitoração de novos sinais e manchas na pele ou mudança nas características destas, detectando assim possíveis alterações sugestivas de malignidade <sup>(1,2)</sup>.

Exposição crônica as radiações ultravioletas A e B constituem importante fator de risco para o câncer de pele <sup>(10,11)</sup>. As radiações ultravioletas B (RUV B) são mais efetivas em induzir alterações gênicas no ácido desoxirribonucléico (DNA) com produção de dímeros de ciclobutano de pirimidina (CPD) e fotoprodutos, os quais estão envolvidos em mutações nas células epidérmicas e desenvolvimento de células cancerígenas <sup>(10)</sup>. Se a frequência de eventos danosos excede a capacidade de reparação do DNA, pode desencadear a formação e progressão do tumor <sup>(12)</sup>. O estresse oxidativo gerado pela excessiva exposição solar exerce grande efeito sobre o sistema imune cutâneo, induzindo a



um estado de imunossupressão local <sup>(10,11)</sup>, comprometendo o sistema de defesa antitumoral <sup>(6)</sup>.

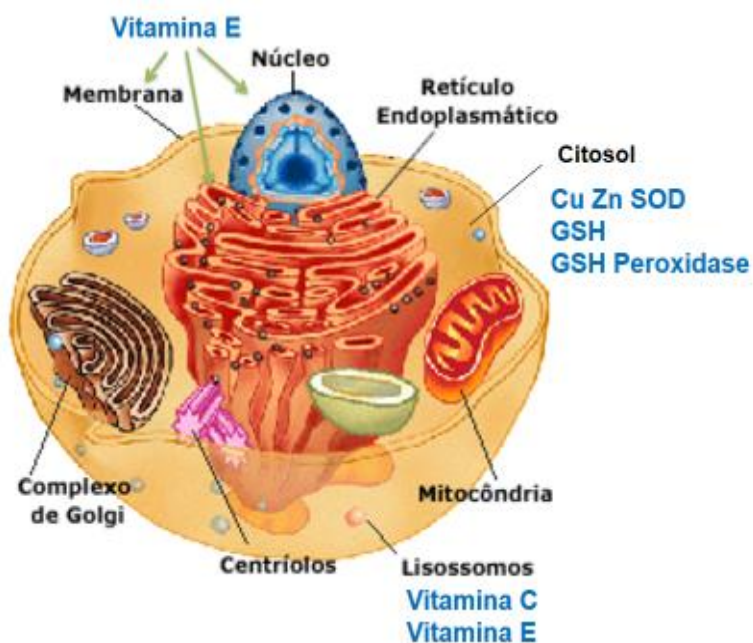
Pesquisas direcionadas aos mecanismos para o restabelecimento do equilíbrio redox da pele como estratégia de prevenção ou tratamento para o CPNM tem sido estimuladas e o uso de antioxidantes desponta como uma alternativa promissora <sup>(13,14)</sup>. Acumulam-se evidências de que os antioxidantes promovem um rápido reparo dos danos oxidativos (por meio do sequestro de espécies reativas de oxigênio na membrana lipídica, por ex.), ajudando a reduzir a produção de radicais livres, a lipoperoxidação lipídica, promovendo reparo os danos ao DNA e proteínas e assim atenuando os danos oxidativos na pele <sup>(13,14)</sup>. No entanto, devem ser considerados os riscos do uso destas substâncias, por via oral ou tópica, uma vez que doses elevadas podem aumentar o risco de câncer de pele <sup>(15,16)</sup>.

A despeito de sua função antioxidante, a vitamina C, assim como o  $\alpha$ -tocoferol, podem atuar como pró-oxidantes, por ser um forte agente redutor, pode reagir com metais de transição, reciclando-os para a reação de Fenton, facilitando a formação de EROs <sup>(8,17)</sup>, o que evidencia a necessidade do equilíbrio e uso criterioso da vitamina C. E ainda são requeridas mais pesquisas para definição dos benefícios do uso isolado ou combinado desses micronutrientes, uma vez que podem refletir resultados diferentes no equilíbrio redox da pele.

Para se proteger dos danos oxidativos, o organismo dispõe de mecanismos de defesa antioxidante endógeno, destacando-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) como inibidores preventivos e ainda sistemas de defesa exógenos, destacando-se os nutrientes antioxidantes fornecidos pela dieta, os quais exercem papel decisivo na defesa primária da agressão oxidativa, como as vitaminas C, E, A e mineral zinco, cobre, selênio.

A Vitamina C é provavelmente o antioxidante extracelular mais efetivo, revelando-se um eficiente doador de elétrons em reações biológicas de redução,

capaz de substituir radicais danosos por radical ascorbato pouco reativo <sup>(17)</sup>. A vitamina E apresenta superior capacidade de prevenir a peroxidação lipídica de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), é o maior antioxidante presente no sangue e nas membranas celulares <sup>(18)</sup>. Assim, quando o dano oxidativo ocorre ne membrana é mais efetivamente prevenido pela vitamina E. O mineral Zinco atua nos mecanismos celulares de defesa antioxidante, é constituinte na enzima SOD, a qual atua catalisando a dismutação de duas moléculas de ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em oxigênio e peróxido de hidrogênio <sup>(17)</sup>. Dessa forma, a suplementação de antioxidantes proposta nesse estudo contempla os três campos de atuação dos sistemas antioxidantes: Plasma (Vitamina C - hidrossolúvel); membrana celular (Vitamina E - lipossolúvel) e a nível celular (mineral Zinco) (figura 1).



**Figura 1. Antioxidantes e locais de ação.** A Figura demonstra a localização celular dos principais antioxidantes. Pode-se observar que a vitamina E está presente principalmente nas membranas e nos lipossomos devido a sua característica de lipossolubilidade. A vitamina C é hidrossolúvel e está presente nos lipossomos e nos líquidos intracelulares. As enzimas antioxidantes Cu, Zn, SOD e as GSHs estão intracelularmente no citosol. Cu Zn SOD Superóxido Dismutase dependente do cobre e zinco; GPX Glutathione peroxidase; GSH Glutathione reduzida. Fonte: Ecologia Medica.ecologiamedica.net <sup>(19)</sup>.

Os resultados de estudos com ênfase na suplementação de antioxidantes na prevenção de câncer de pele são controversos. Ensaio clínico conduzido para testar o impacto da suplementação de altas doses destes nutrientes por período mais longo de tempo, falharam em revelar os efeitos benéficos sobre a incidência do Câncer de pele<sup>(15,16)</sup>. A controvérsia encontra suporte na dose suplementada, no período de suplementação, em fatores dietéticos e no *status* antioxidante endógeno.

Põe-se em relevo a avaliação do estresse oxidativo em pessoas que tiveram e não tiveram câncer de pele não melanoma, tomando-se por base o estudo dos marcadores de estresse oxidativo.

Para nortear o estudo, foram formuladas as seguintes perguntas de partida:

- Existem diferenças no perfil oxidativo de pessoas que nunca apresentaram CPNM e pessoas que já apresentaram CPNM?
- Existem alterações nos marcadores de estresse oxidativo de pessoas que apresentaram CPNM, após suplementação de vitaminas C, E e mineral Zinco?

Dessa feita, os resultados da pesquisa podem contribuir para consolidar novos formatos terapêuticos e programar uma abordagem preventiva eficaz, com definição de recomendações quanto a doses e quanto ao uso combinado desses nutrientes. Sustentando a proposição de recomendações que visem à adoção de hábitos comportamentais saudáveis, otimizando o papel protetor representado pela exposição adequada ao sol, combatendo o tabagismo e implementando hábitos alimentares saudáveis que garantam um aporte satisfatório de nutrientes antioxidantes.



## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**





## 2.1. Epidemiologia do Câncer de Pele

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima cerca de 580 mil casos novos de câncer para 2014. De acordo com a publicação Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil, os cânceres mais incidentes na população brasileira neste ano serão pele não melanoma (182 mil), próstata (69 mil); mama (57 mil); cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil) e estômago (20 mil)<sup>(1)</sup>.

Os principais fatores etiológicos do câncer de pele (CP) são; história familiar, sensibilidade ao sol, exposição crônica ao sol e exposição ocupacional a carcinógenos e imunossupressão<sup>(8)</sup>. Apesar de grandes esforços para conscientizar a população acerca de estratégias preventivas do CP, como: evitar exposição ao sol e uso de protetores solares; abordagens adicionais ainda são necessárias para controlar e prevenir o CP<sup>(8)</sup>.

Os tipos de câncer de pele são: câncer de pele melanoma e câncer de pele não melanoma (CPNM). O CPNM é o mais frequente para ambos os sexos, apresentando um risco de 42/100 mil habitantes na região nordeste. Apesar de seu impacto para a saúde pública e as altas taxas de incidência, permanece a subnotificação pela maioria dos registros de câncer do mundo e, acredita-se que tal fato decorra, sobretudo, do subdiagnóstico<sup>(1)</sup>.

O CPNM engloba o CBC e o CEC<sup>(3)</sup>. É o mais frequente das neoplasias epiteliais, com 70-80% do total<sup>(3)</sup>. Em função de suas altas prevalências mundiais são considerados um crescente problema para a saúde pública mundial<sup>(1)</sup>. Porém, apesar das altas taxas de incidência, o CPNM apresenta altos índices de cura, principalmente devido à facilidade do diagnóstico precoce e tratamento efetivo<sup>(1,3,6)</sup>.

Nos últimos 40 anos, a incidência de melanoma cutâneo apresentou, mundialmente, uma tendência de crescimento; e no Brasil, ressalta-se que a

tendência da mortalidade por melanoma ainda é de crescimento<sup>(20)</sup>. O melanoma cutâneo prevalece em adultos brancos, representando uma pequena porcentagem dos cânceres de pele (4%)<sup>(20,21)</sup>. É um câncer muito agressivo, que não responde à terapia convencional, associando-se, portanto, a piores prognósticos<sup>(14)</sup>. Estima-se que seja responsável por 1% a 2% das mortes por câncer<sup>(20)</sup>.

No Brasil, o melanoma maligno corresponde a 0,1% de todas as neoplasias malignas<sup>(1,3)</sup>. Muito mais frequente na faixa etária dos 30 aos 60 anos e acomete ambos os sexos em igual proporção, sendo no homem mais comum no dorso e, na mulher, nos membros inferiores<sup>(20,21)</sup>.

## **2.2. Câncer de Pele Melanoma**

O melanoma maligno é, entre as neoplasias de pele, o de pior prognóstico. Desenvolvem-se a partir da transformação maligna dos melanócitos, células produtoras de melanina, que se originam embriologicamente da crista neural, sendo a pele seu principal sítio primário. Os melanócitos são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo, cronicamente gerado na melanogênese, devido ao efeito pró-oxidante da melanina<sup>(22,23)</sup>.

Reitera-se que o melanoma é menos frequente que os CBC e CEC, entretanto, apesar de ter uma incidência relativamente baixa, assume grande importância devido ao seu elevado potencial de gerar metástases e a sua letalidade<sup>(20)</sup>.

Vários fatores têm sido atribuídos como de risco para o desenvolvimento dessas neoplasias, tais como: cor da pele, horário e tempo de exposição ao sol, residir em um país tropical, fazer uso de imunossupressão crônica<sup>(23)</sup>. Ressalta-se que os fotótipos I e II de Fitzpatrick, ou seja, indivíduos que apresentam pele, cabelos e olhos claros e se queimam facilmente ao invés de se bronzear, representam os grupos mais vulneráveis a esta neoplasia<sup>(24)</sup>. Outros fatores de



risco são: presença de lesões pigmentadas como efélides, nevos atípicos ou grande número de nevos comuns (mais de 50), exposição solar intermitente, queimaduras solares (especialmente durante a infância), uso de camas de bronzamento e melanoma cutâneo prévio. História familiar positiva tanto para melanoma como para múltiplos nevos atípicos também é fator relevante. Mutações nos genes CDKN2A e CDK4 foram detectadas em algumas famílias com melanoma hereditário, conferindo um risco aumentado de 60% a 90% para essa neoplasia <sup>(23)</sup>.

### **2.3. Câncer de Pele não Melanoma**

O CBC, epitelioma basocelular ou basalioma, é o mais benigno dos tumores malignos da pele. É constituído por células que se assemelham as células basais da epiderme, originam-se de células epiteliais imaturas pluripotentes que perderam sua capacidade de diferenciação e queratinização normais, pela interferência de vários fatores, como a ação crônica de RUVB <sup>(3)</sup>. Pode ser considerado como incapaz de gerar metástases, mas possui malignidade local, podendo invadir e destruir tecidos adjacentes, inclusive ossos <sup>(3)</sup>.

As falhas de registro de seus dados de prevalência podem ser por subdiagnóstico, por uma característica indolente do seu portador e pela instituição de um tratamento adequado e oportuno. Por essa razão, as estimativas das taxas de incidência e dos números esperados de casos novos de CPNM devem ser consideradas estimativas mínimas <sup>(1, 23)</sup>.

No Brasil, os números mostram uma tendência de crescimento, sobretudo em São Paulo e na região sul, em função de vários fatores epidemiológicos: exposição ao sol excessiva, predominância de raça branca e grande quantidade de imigrantes de origem caucasiana <sup>(23)</sup>. Martinez *et al.* <sup>(23)</sup> enfatizam os fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento do CPNM, incluindo: raça, idade, gênero, exposição crônica a agentes mutagênicos químicos e físicos, além de

fatores genéticos. Vários estudos evidenciam o envolvimento da exposição excessiva à RUV, em especial à RUVB, com o aumento do risco para o desenvolvimento dos cânceres cutâneos incluindo o CBC e CEC <sup>(23)</sup>.

Fatores de risco constitucionais mais importantes são: os fotótipos I e II de Fitzpatrick, indivíduos que se queimam facilmente ao invés de se bronzear, história familiar positiva de CBC (30 a 60%), sardas na infância, indivíduos que apresentam pele, cabelos e olhos claros <sup>(6,24)</sup>. Sampaio e Rivitti <sup>(3)</sup> enfatizam que ocorrem geralmente em indivíduos acima de 40 anos, tendo como principais fatores de risco: pele clara e exposição excessiva a luz solar. Outras causas desencadeantes são prévias irradiações radioterápicas e absorção de compostos de arsênico.

Indivíduos que trabalham com exposição direta ao sol são mais vulneráveis a este câncer <sup>(1)</sup>. Apesar de apresentar maior incidência em adultos, com a constante exposição de jovens aos raios solares, a média de idade dos pacientes vem diminuindo. A maior incidência deste tipo de câncer de pele se dá na região da cabeça e do pescoço, que são justamente os locais de exposição direta aos raios solares <sup>(20)</sup>. Sampaio e Rivitti <sup>(3)</sup> reforçam que a localização preferencial ocorre nos dois terços superiores da face, acima de uma linha passando pelos lóbulos das orelhas e comissuras labiais.

A exposição às RUV constitui o principal fator de risco ambiental na carcinogênese cutânea. Há evidências de que em peles com exposição crônica ao sol, há maior incidência de mutações no gene supressor de tumor p53 pelo estresse oxidativo ocasionado <sup>(6)</sup>. A RUV pode causar alterações gênicas no DNA dos queratinócitos, sendo que a falha no reparo dessas alterações gênicas pode levar a crescimento celular desordenado e formação de tumor <sup>(23)</sup>. Além disso, tem grande efeito sobre o sistema imune cutâneo, induzindo a um estado de imunossupressão local que impede a rejeição do tumor neoformado. Com a exposição aos raios solares, ocorre diminuição das células das Langerhans,

responsáveis pela resistência imunológica da pele, provocando inflamação, modificação oxidativa das proteínas e desregulação do *status* celular redox<sup>(11,12)</sup>.

Outro fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pele é o tabagismo. Os mecanismos fisiopatológicos, pelos quais o fumo propicia alterações na pele, são complexos. A fumaça do cigarro contém mais de 4.000 substâncias tóxicas, mas é a nicotina o composto mais nocivo. Ela é responsável pela vasoconstrição, que gera diminuição do fluxo sanguíneo, cujo mecanismo ainda é desconhecido; porém, acredita-se que a nicotina estimule a vasopressina. Além disso, o fumo atua no sistema nervoso simpático, que também causa vasoconstrição. Esses fatores, em conjunto, geram hipóxia tissular significativa, gera lesão das fibras elásticas e diminuição da síntese do colágeno<sup>(25)</sup>.

O tipo clínico mais frequente é o chamado epiteloma basocelular nódulo-ulcerativo. No início, manifesta-se na forma de pápula rósea, que evolui ao nódulo, com posterior ulceração central, recoberta por crosta que, retirada, provoca sangramento. Com a progressão do quadro, pode haver extensão em superfície, às vezes com cicatrização central ou em profundidade, com invasão e destruição de músculo, cartilagem, osso ou outras estruturas, ou há proliferação central<sup>(3)</sup>.

### **2.3.1. Diagnóstico e Tratamento**

A diagnose é, em geral, clínica e deve ser confirmada histopatologicamente, e na diagnose diferencial devem ser considerados: as queratoses actínicas, o queratoacantoma, o epiteloma basocelular, a disqueratose de Bowen, queratoses seborréicas, melanoma amelanótico, tumores de células de Merkel, além de tumores malignos de anexos<sup>(3)</sup>.

Lesões recentes e menores que 1 cm na pele podem ser tratadas com eletrocoagulação e curetagem; as lesões maiores devem ser excisadas com suficiente margem de garantia com superfície e profundidade (0,5 cm). Outro recurso terapêutico é a criocirurgia por nitrogênio líquido; nas lesões extensas ou

de longa duração, com ou sem invasão ganglionar, é indicada exérese ampla. Em CEC com metástases em linfonodos é necessária a linfadenectomia e radioterapia complementar. E quando estes tumores estão muito avançados, não passíveis de tratamento cirúrgico e radioterapia, utiliza-se a quimioterapia regional intra-arterial, dependendo da localização a topografia do tumor, para minimizar os efeitos colaterais decorrentes de concentrações sanguíneas elevadas das drogas. Os quimioterápicos mais empregados são: cisplatina, metotrexato, ciclofosfamida, 5-fluoracil e bleomicina <sup>(3)</sup>.

## 2.4 Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

Radicaís livres são espécies cuja reatividade resulta da presença de um ou mais elétrons desemparelhados na estrutura atômica, capazes de existência independente, em intervalos de tempo variáveis <sup>(13, 26)</sup>.

**Quadro 1.** Espécies Reativas de Oxigênio.

RADICAIS	NÃO RADICAIS
Superóxido $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrogênio $H_2O_2$
Hidroxila $OH^{\cdot}$	Ácido hipocloroso $HOCl$
Peroxila $LO_2$	Ozônio $O_3$
Alcoxila $LO^{\cdot}$	Oxigênio <i>singlete</i> $^1O_2$
Hidroperoxila $HO_2$	Peróxidos lipídicos $LOOH$

Fonte: Halliwell B. <sup>(26)</sup>.

O elétron livre, que caracteriza o radical livre, pode estar centrado em um átomo de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de transição <sup>(27)</sup>. O oxigênio no estado fundamental ( $O_2$ ) e o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) são as duas mais importantes substâncias que podem gerar radicaís livres na natureza <sup>(27)</sup>.

As espécies reativas de oxigênio (ERO) referem-se a termos que incluem não somente radicais de oxigênio ( $O_2^{\cdot-}$  e  $OH^{\cdot}$ ), mas também derivados de  $O_2$  que não contém elétrons desemparelhados, como:  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ ,  $HOCl$  <sup>(28,29)</sup>. As espécies reativas de nitrogênio (ERN) incluem o  $NO^{\cdot}$ , dióxido de nitrogênio ( $NO_2^{\cdot}$ ), o peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), que não é um radical livre e encontra-se em sítios de injúria tecidual <sup>(29)</sup>.

Quando dois radicais livres se encontram, compartilham seus elétrons não pareados, formam uma ligação covalente e se aniquilam mutuamente <sup>(29)</sup>. Contudo, quando reagem com outras moléculas que não são radicais, novos radicais livres são gerados, promovendo uma amplificação do efeito danoso <sup>(26,30)</sup>.

#### **2.4.1 Produção de ROS (Radicais livres de oxigênio) e RNS (Radicais livres de nitrogênio)**

As principais fontes de ROS (radicais livres de oxigênio) e RNS (radicais livres de nitrogênio) são: Exposição à RUV; reações catalisadas por metais, estão presentes como poluentes na atmosfera <sup>(8)</sup>, produção pelos neutrófilos e macrófagos durante a inflamação; produzidos como subprodutos de mitocôndrias catalisados pelas reações de transporte de elétrons e outros mecanismos <sup>(8,30)</sup>.

Conforme reforça Abdalla <sup>(27)</sup> a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ocorre em consequência de diversos processos metabólicos no organismo, mas podem ser produzidos exogenamente por meio de agressões exógenas, incluindo o fumo e a exposição ao sol <sup>(27)</sup>.

A produção de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) constitui uma característica intrínseca ao metabolismo aeróbico e, quando produzidos em grande quantidade, exercem efeitos danosos sobre as macromoléculas, por provocar a oxidação de ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas e lipídios,

acarretando: mutações genéticas, disfunção e agregação de proteínas e comprometimento de membranas biológicas<sup>(13,31)</sup>.

No mesmo sentido, Volko *et al.*<sup>(31)</sup> salientam que fontes endógenas de radicais livres incluem: cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, metabolismo da enzima citocromo P450, peroxissomos e ativação de células inflamatórias. A mitocôndria é responsável por uma expressiva produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a qual é estimada em aproximadamente 2% do total de oxigênio no organismo<sup>(31)</sup>.

Halliwell e Cross<sup>(28)</sup> reforçam que fontes endógenas adicionais de ERO são: os neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, ocorrendo a deliberada geração metabólica de EROs (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HOCl e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por ativação fagocítica<sup>(28)</sup> e ainda por reações de autooxidação, nas quais compostos como: catecolaminas, ácido ascórbico e flavina reduzida reagem diretamente com o O<sub>2</sub> para formar O<sub>2</sub><sup>-</sup><sup>(28)</sup>.

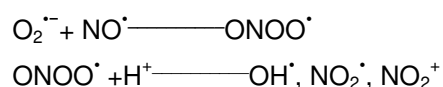
Diplock *et al.*<sup>(32)</sup> reforçam que células fagocíticas são responsáveis pela produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sup>•</sup> como parte do processo de destruir corpos estranhos<sup>(32)</sup>. Muitas doenças são acompanhadas de excessiva atividade inflamatória, cuja origem decorre da atividade dos RLs, resultando em danos aos tecidos<sup>(32)</sup>.

O metabolismo de citocromo P450 é fonte de EROs, principalmente o ânion O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>(31)</sup>. Microsossomos são responsáveis pela produção de até 80% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzidos nos sítios de hiperóxia. Oxidação peroxissomal de ácidos foi recentemente reconhecida como uma importante fonte de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como resultado de prolongada inanição<sup>(31)</sup>.

Sob condições normais, 95% ou mais do oxigênio molecular consumido pelas células sofre redução tetravalente, recebendo quatro elétrons, resultando na formação de água (H<sub>2</sub>O), através do complexo citocromo oxidase<sup>(13,29,33)</sup>. Cerca de 1-2% do oxigênio sofre redução por um número menor de elétrons, ao longo da cadeia respiratória, formando ânion O<sub>2</sub><sup>-</sup>, pela transferência direta de um elétron para o oxigênio, ao nível de ubiquinona ou do complexo NADH desidrogenase<sup>(27)</sup>.

As ERO podem interferir em muitos processos intracelulares, e como resultado induzem mutagênese ou comprometimento em sistemas biológicos, que podem afetar a sobrevivência das células <sup>(34)</sup>.

O NO<sup>•</sup> é um gás inorgânico, eletricamente neutro, apresentando, porém, um elétron não pareado em seu último orbital eletrônico, o que lhe confere a classificação de radical livre <sup>(30)</sup>; é considerado um radical muito reativo, uma vez que pode interagir com o radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, dando origem via peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), ao dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) e ao altamente reativo radical OH<sup>•</sup> <sup>(31)</sup>.



O ONOO<sup>-</sup> é capaz de induzir a lipoperoxidação das lipoproteínas e também interferir na sinalização celular pela nitrosilação de resíduos de tirosina <sup>(33)</sup>. Em pH fisiológico, o ONOO<sup>•</sup> é protonado, formando o ácido peroxinitroso, o qual, rapidamente, se dissocia em dois potentes radicais livres: radical OH<sup>•</sup> e o NO<sub>2</sub><sup>(31,33)</sup>.

O NO<sup>•</sup> é produzido por células endoteliais, macrófagos e por neurônios centrais específicos <sup>(33,36)</sup> e sintetizado a partir do L-arginina, oxigênio (O<sub>2</sub>) e nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) por meio da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que é ativada pelo aumento do influxo de cálcio no interior da célula. Fisiologicamente, atua mantendo o tônus vascular inibindo a agregação plaquetária e a adesão dos neutrófilos e plaquetas ao endotélio vascular <sup>(36)</sup>.

Os efeitos benéficos das espécies reativas podem ser evidenciados quando estas se encontram em baixas ou moderadas concentrações <sup>(26,27)</sup>, e, consistem na proteção contra agentes infecciosos, ativação de sistemas de sinalização celular, indução da resposta mitogênica <sup>(31)</sup>, manutenção do *status* celular redox <sup>(29,30,33)</sup>.

## 2.4.2. Toxicidade das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio

As reações dos radicais livres podem levar a formação de complexos com proteínas, glicoproteínas, purinas e pirimidinas, formação de produtos de oxidação de tióis, peróxidos lipídicos, polímeros, epóxidos, endoperóxidos e produtos de cisão como alquenais e hidroalquenais, que são citotóxicos <sup>(26,37)</sup>.

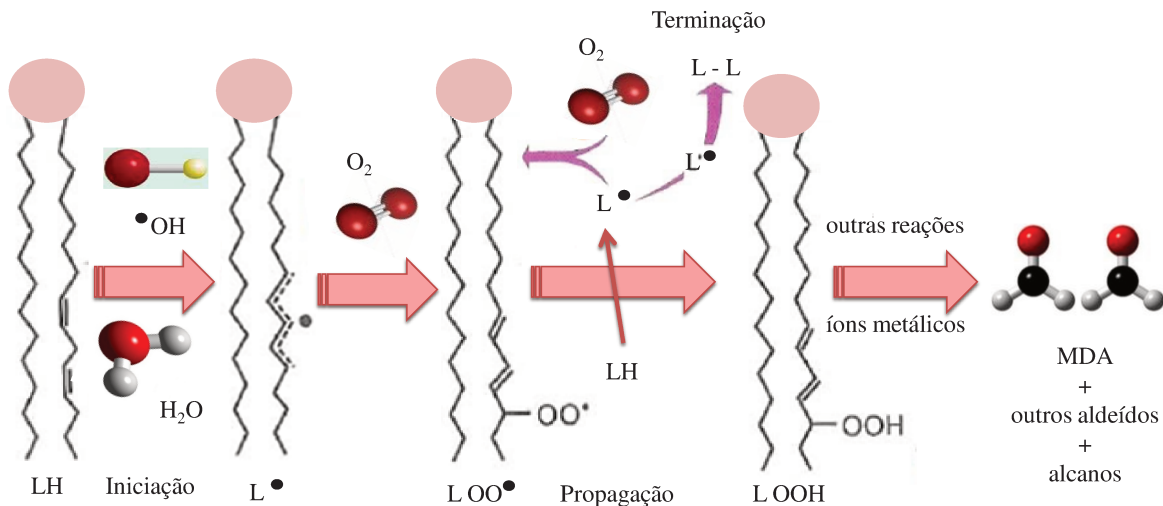
Segundo Volko *et al.* <sup>(31)</sup>, o radical  $\text{OH}^\bullet$  pode ser gerado através de uma variedade de mecanismos: a radiação ionizante provoca a decomposição da  $\text{H}_2\text{O}$ , resultando na formação de  $\text{OH}^\bullet$  e átomos de hidrogênio; também pode ser gerado por decomposição fotolítica de alquilhidroperóxidos e pela catálise de metais na reação de Fenton <sup>(35)</sup>. Assim, a formação do radical  $\text{OH}^\bullet$  pela participação de outros radicais pode ser:

- A partir do radical  $\text{ONOO}^\bullet$
- A partir do radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pela reação de Fenton;
- A partir da reação de radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  com o  $\text{HOCl}$ , gerado por atividade neutrofílica <sup>(26)</sup>.

Torres <sup>(38)</sup> ressalta que o radical  $\text{OH}^\bullet$  é uma espécie oxidante muito instável, portanto tem um importante papel na iniciação da peroxidação lipídica retirando um átomo de hidrogênio dos ácidos poliinsaturados, com consequente produção de um radical lipídico. O radical  $\text{L}^\bullet$  reage com o oxigênio molecular, formando  $\text{LOO}^\bullet$  (Radical peroxila). Ao retirar hidrogênio de outro lipídico, o radical  $\text{LOO}^\bullet$  inicia a fase de propagação, já que há formação de um hidroperóxido de lipídico ( $\text{LOOH}^\bullet$ ) e outro  $\text{L}^\bullet$  reage com oxigênio e assim por diante. Na fase final, dois radicais reagem entre si e formam um não radical (Figura 2). O  $\text{LOOH}^\bullet$  pode sofrer outras reações, com consequente produção de alcanos e aldeídos de diferentes tamanhos, como por exemplo, o malonaldeído (MDA), utilizado como marcador de peroxidação lipídica <sup>(38)</sup>.

A figura 2 demonstra o processo da peroxidação lipídica.

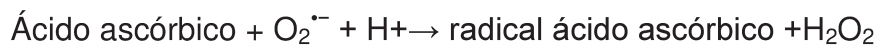




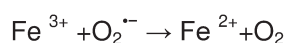
**Figura 2. Esquema do Processo de Peroxidação Lipídica.** O radical  $\text{OH}^\bullet$  é uma espécie oxidante muito instável, portanto tem um importante papel na iniciação da peroxidação lipídica retirando um átomo de hidrogênio dos ácidos poliinsaturados, com conseqüente produção de um radical lipídico. O radical  $\text{L}^\bullet$  reage com o oxigênio molecular, formando  $\text{LOO}^\bullet$  (Radical peroxila). Ao retirar hidrogênio de outro lipídio, o radical  $\text{LOO}^\bullet$  inicia a fase de propagação, já que há formação de um hidroperóxido de lipídio ( $\text{LOOH}^\bullet$ ) e outro  $\text{L}^\bullet$  reage com oxigênio e assim por diante. Na fase final, dois radicais reagem entre si e formam um não radical. O  $\text{LOOH}^\bullet$  pode sofrer outras reações, com conseqüente produção de alcanos e aldeídos de diferentes tamanhos, como por exemplo, o malonaldeído (MDA), utilizado como marcador de peroxidação lipídica <sup>(38)</sup>.  $\text{OH}^\bullet$  radical hidroxila,  $\text{O}_2$  oxigênio molecular, LH lipídio,  $\text{L}^\bullet$  radical lipídico,  $\text{H}_2\text{O}$  água,  $\text{LOO}^\bullet$  radical peroxila,  $\text{LOOH}^\bullet$  radical hidroperóxido lipídico, MDA malondialdeído. Fonte: Augusto <sup>(39)</sup>.

Quando o radical  $\text{OH}^\bullet$  é produzido próximo ao DNA pode reagir com as bases nitrogenadas e desorribonucleases do DNA provocando danos nestas ou ruptura na cadeia de DNA <sup>(17,29)</sup>. Tem sido proposto que a extensão da cadeia de DNA quebrada pelo radical  $\text{OH}^\bullet$  é determinada pelas superfícies acessíveis dos átomos de hidrogênio da espinha dorsal do DNA <sup>(31)</sup>.

O ânion  $\text{O}_2^{\bullet -}$  é o mais comum e abundante radical existente nas células; a sua força oxidante difere do local onde está dissolvido. Em água, o  $\text{O}_2^{\bullet -}$  não é muito reativo, atuando na captação de mais elétrons, por exemplo: podendo oxidar o ácido ascórbico <sup>(30)</sup>.



Em meio aquoso, atua mais frequentemente como agente redutor <sup>(30)</sup>:



Em meio aquoso, sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio <sup>(17,28)</sup>.

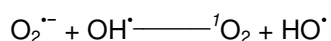


Ele também é uma base fraca cujo ácido conjugado, o radical hidroperóxido (HOO<sup>•</sup>) é mais reativo <sup>(17)</sup>.



O ânion  $O_2^{\cdot-}$  é produzido na mitocôndria pela cadeia de transporte de elétrons, pela enzima xantina oxidase, a qual catalisa a reação da hipoxantina a xantina e desta para ácido úrico (nestas etapas o oxigênio molecular é reduzido formando  $O_2^{\cdot-}$ ) <sup>(31,34)</sup>, e ainda pela enzima NADPH oxidase. Estima-se que 1 a 3% do oxigênio consumido é convertido em  $O_2^{\cdot-}$  <sup>(31,32)</sup>. Durante o "burst" das células fagocíticas como: monócitos, macrófagos, leucócitos, ocorre a formação de  $O_2^{\cdot-}$  na via metabólica catalisada pela NADPH oxidase, dando origem ao HOCL, que é um importante bactericida <sup>(31)</sup>.

O ânion radical  $O_2^{\cdot-}$  é capaz de inativar enzimas bacterianas como: Escherichia coli dihidroxiácido desidratase, aconitase, 6 fosfogluconato desidratase <sup>(29)</sup>. Além disso, o radical ânion radical  $O_2^{\cdot-}$  possui a habilidade de liberar  $Fe^{2+}$  das proteínas de armazenamento e de ferro-sulfoproteínas, tais como ferritina e aconitase <sup>(17,30,40)</sup>, respectivamente. Também reage com o radical HO<sup>•</sup> produzindo oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e com o óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) produzindo ONOO<sup>•</sup> <sup>(40)</sup>.



A reação de dismutação espontânea ou catalisada enzimaticamente, bem como o metabolismo mitocondrial e a atividade de algumas enzimas (xantina,

urato, e aminoácidos oxidases) podem originar  $H_2O_2$  <sup>(41)</sup>. Enzimas como: xantinas oxidases, succinato desidrogenase, ácido graxo desidrogenase, lactato oxidase, urato oxidase, D-aminoácido oxidase podem gerar  $H_2O_2$  diretamente <sup>(31)</sup>. Este é um agente oxidante fraco, porém oxida grupos tiol e alguns aminoácidos, podendo inativar enzimas <sup>(41)</sup>. É difusível entre membranas e pode originar o radical  $HO^{\bullet}$  <sup>(41)</sup>.

O  $H_2O_2$  pode regular a expressão gênica pelo remanejamento de uma subunidade inibitória do gene citoplasmático de transcrição do fator nuclear  $NF-\kappa\beta$  <sup>(26,31,33)</sup>. O  $H_2O_2$  em altas concentrações interfere na produção de ATP (Adenosina Trifosfato), por induzir a oxidação de grupos sulfidrilas de enzimas glicolíticas <sup>(26)</sup>. Seus alvos diretos incluem enzimas como: gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase, cetoácidos como o piruvato e o oxaglutamato e grupos heme <sup>(13,41)</sup>.

O potencial tóxico de  $O_2^{\bullet-}$  e de  $H_2O_2$  envolve a formação do radical  $OH^{\bullet}$  <sup>(26)</sup>.

O  $NO^{\bullet}$  pode interagir com o radical  $O_2^{\bullet-}$ , originando o  $ONOO^{\bullet}$  <sup>(36)</sup>. A interação de  $ONOO^{\bullet}$  com proteínas resulta na formação de nitrotirosinas, devido à adição de um grupo nitro ( $NO_2$ ), esta reação pode ser catalisada por metais de transição e SOD <sup>(28)</sup>.

Uma vez que  $NO^{\bullet}$  é solúvel em solução aquosa, prontamente se difunde através do citoplasma e da membrana. O  $NO^{\bullet}$  tem efeitos sobre a transmissão neuronal, bem como sobre a plasticidade sináptica no sistema nervoso central. No meio extracelular, o  $NO^{\bullet}$  reage com o oxigênio e água para formar os ânions nitrato e nitrito <sup>(32,36)</sup>.

A reação das EROs com os lipídios das membranas desencadeia um processo chamado peroxidação lipídica, que é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação <sup>(9,17,41-45)</sup>. Em decorrência da peroxidação lipídica, verifica-se alteração na estrutura e na permeabilidade da membrana celular, com perda de seletividade nas trocas

iônicas, com expansão do líquido intracelular e risco de ruptura das membranas das células e organelas, com morte celular <sup>(43)</sup>.

As moléculas protéicas sofrem importantes alterações pela ação danosa das espécies reativas, ocorrendo clivagens de ligações com ou sem geração de fragmentos e ligações cruzadas, afetando a função de receptores, enzimas, transporte de proteínas, e até gerando novos antígenos, capazes de provocar uma resposta imune. Assim, contribuindo secundariamente para danos a outras moléculas: perda funcional das enzimas reparadoras e na replicação do DNA <sup>(17,46)</sup>.

A produção contínua de RL durante os processos metabólicos impôs ao organismo o desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, a fim de reduzir as concentrações intracelulares dos oxidantes e impedir a indução de danos, garantindo a homeostase <sup>(47)</sup>.

### 2.4.3. Não Radicais

O ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) e ozônio (O<sub>3</sub>) não são radicais livres, não possuem elétrons desemparelhados no orbital externo, mas podem facilmente conduzir reações de radicais livres em organismos vivos <sup>(27,29)</sup>.

O <sup>1</sup>O<sub>2</sub> é a forma mais reativa do oxigênio no organismo humano, podendo ser gerado pela absorção de energia térmica ou fotoquímica, provocando um rearranjo de elétrons <sup>(27,30)</sup>. Complexas reações entre o ozônio e várias moléculas biológicas e a peroxidação lipídica também podem produzir <sup>1</sup>O<sub>2</sub> <sup>(31,48)</sup>.

O <sup>1</sup>O<sub>2</sub> pode interagir com outras moléculas, quer transferindo a sua energia de excitação ou combinando-se quimicamente. As metas preferenciais para as reações químicas são ligações duplas, por exemplo, em ácidos graxos polinsaturados (PUFA) ou guanina em bases de DNA <sup>(33)</sup>.

O  $^1\text{O}_2$  oxida biomoléculas como lipídios, proteínas, aminoácidos, ácidos nucléicos, carboidratos e tióis <sup>(48)</sup>. As proteínas são alvos importantes do  $^1\text{O}_2$ , pois estão presentes em altas concentrações nos sistemas biológicos e as cadeias laterais de seus aminoácidos possuem constantes elevadas de desativação total do  $^1\text{O}_2$  <sup>(48)</sup>. O  $^1\text{O}_2$  pode ainda reagir com compostos fenólicos para formar hidroperoxidienonas e com sulfetos, formando sulfóxidos <sup>(48)</sup>.

O HOCL<sup>•</sup> é produzido a partir de oxigênio pelos neutrófilos, enzimas NADPH oxidase e mieloperoxidase, ONOO<sup>•</sup> e mesmo NO<sup>•</sup>. O HOCL<sup>•</sup> é considerado um potente oxidante e atua na atividade imunológica fagocitária <sup>(33)</sup>.

## 2.5. Estresse Oxidativo e Sistema de Defesa Antioxidante

Diante do desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros, instala-se o estresse oxidativo <sup>(29)</sup>, o qual pode causar danos ao DNA, proteínas, lipídios e carboidratos <sup>(29,31)</sup>.

O estresse oxidativo pode ser provocado por diferentes mecanismos:

- Diminuição das concentrações dos antioxidantes endógenos ou depleção dos antioxidantes dietéticos: mutações provocam depleção de enzimas antioxidantes, severa desnutrição provoca depleção de minerais cobre, manganês, zinco e vitaminas <sup>(28)</sup>;
- Aumento da produção de oxidantes: exposição às RUVs, metabolismo de drogas e toxinas, o fumo aumenta a produção de EROs e ERNs <sup>(30)</sup>, excessiva ativação de células fagocíticas nas doenças inflamatórias <sup>(31)</sup>.

Uma substância antioxidante pode ser definida como: “aquela que, quando presente em baixas concentrações, comparada ao substrato oxidável, deleta ou previne, significativamente a oxidação desse substrato” <sup>(31,42,43,46)</sup>. Do ponto de vista biológico, podem-se definir antioxidantes como: compostos que protegem

sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares<sup>(13,49,50)</sup>. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células<sup>(41,42,49)</sup>.

O dano oxidativo potencial é maior do que a defesa antioxidante e, assim, há uma pequena quantidade constante de RL tóxicos formados que escapam dos mecanismos de defesa celular. As estimativas sobre a quantidade de oxigênio que reage diretamente para gerar radicais livres variam; no entanto, valores tipicamente citados oscilam em torno de 1,5-5% do total de oxigênio consumido<sup>(49)</sup>.

Halliwell e Gutteridge<sup>(30)</sup> elencam os diversos mecanismos por meio dos quais as substâncias antioxidantes protegem os alvos celulares de ataques dos radicais livres:

- Removendo as espécies reativas de oxigênio usando enzimas catalíticas ou diretamente por reações químicas;
- Minimizando a produção de radicais livres;
- Blindando íons de metais requeridos para transformar espécies pouco reativas em mais reativas;
- Reparando os danos sofridos no salvos celulares;
- Destruindo ou reparando moléculas<sup>(30)</sup>.

Os antioxidantes agem em três linhas de defesa orgânica contra as EROs<sup>(13,47,51)</sup>. A primeira linha é a de prevenção, e se caracteriza pela proteção contra a formação das substâncias agressoras, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o Ferro e Cobre<sup>(44,49)</sup>. Esta linha é constituída por GSH, SOD, CAT, GSH-Px e vitamina E<sup>(43,51)</sup>.

A segunda linha é a interceptação, os antioxidantes precisam interceptar os radicais livres, os quais, uma vez formados, iniciam suas atividades destrutivas, assim evitando a formação de lesões e perda da integridade celular <sup>(47,51)</sup>.

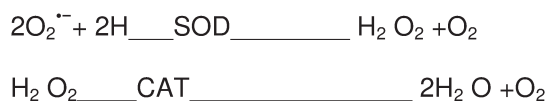
E a última linha é o reparo das lesões causadas pelos radicais <sup>(47,51)</sup>. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas <sup>(47)</sup>. Esta etapa ocorre quando a prevenção e a interceptação não foram completamente efetivas e os produtos da destruição pelos radicais livres estão sendo continuamente formados em baixas quantidades e desta forma podem se acumular no organismo <sup>(49,51)</sup>.

Enzimas antioxidantes, quelantes e proteínas como a transferrina e a ceruloplasmina que transportam ferro e cobre, respectivamente, impedindo que estes metais sejam liberados e catalisem a formação de espécies oxidantes e substâncias não enzimáticas como o urato, ascorbato, albumina, bilirrubina e carotenóides participam da defesa antioxidante <sup>(52)</sup>.

No compartimento plasmático, substâncias como o ascorbato, urato,  $\alpha$  tocoferol, bilirrubina ligada à albumina e a própria albumina são importantes para a proteção antioxidante dos componentes do plasma e das células do endotélio vascular. Os antioxidantes lipossolúveis como o  $\alpha$  tocoferol,  $\beta$  caroteno e ubiquinol, dentre outros, são importantes para a proteção das membranas celulares e das lipoproteínas do compartimento plasmático <sup>(47,49)</sup>.

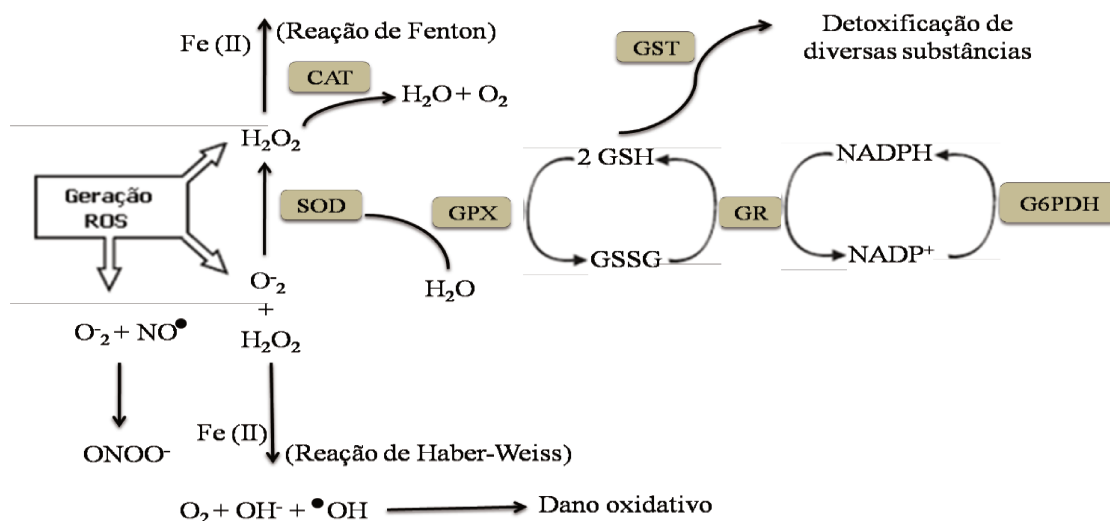
Os inibidores preventivos constituem o sistema primário, que retardam a fase de iniciação, impedindo a geração de espécies reativas ou sequestram essas espécies, impedindo sua interação com alvos celulares <sup>(27,49)</sup>. Seus principais exemplos são: os quelantes, tióis, sulfetos, as enzimas antioxidantes: CAT, peroxidase e GPx e substâncias não enzimáticas como: urato, ascorbato, albumina, bilirrubina e carotenóides que seqüestram radicais  $O_2^{\cdot-}$  e  $OH^{\cdot}$  ou suprimem o  $^1O_2$  <sup>(27)</sup>.

Os sistemas enzimáticos de defesa antioxidante operam em conjunto, incluindo as enzimas do ciclo redox da glutatona, particularmente a GPx, a SOD, que atua promovendo a dismutação do radical  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ , assim como a enzima CAT, que converte  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  nas hemáceas<sup>(30)</sup>:



A glutatona opera em conjunto com as enzimas GPx e GR (glutaciona redutase)<sup>(17)</sup>. A glutatona reduzida (GSH) tem uma importante função na proteção antioxidante, sequestrando os RLO ou como cofator do sistema enzimático GSH-dependente<sup>(34)</sup>.

A Figura 3 demonstra o papel das enzimas antioxidantes na defesa do estresse oxidativo.



**Figura 3. Sistemas de Defesa Antioxidante Enzimático.** Após a geração dos ROS as enzimas antioxidantes atuam nestas espécies para diminuição das mesmas. Duas importantes reações de formação de ROS é a Reação de Fenton e de Haber-Weiss. A SOD atua na dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  e a CAT atua na degradação do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . A GPx tem um importante papel na detoxificação do organismo e catalisa a redução de  $H_2O_2$  e de  $LOOH^{\cdot}$ . ROS Espécies reativa de Oxigênio. SOD superóxido dismutase, CAT catalase; GPx Glutaciona peroxidase; GSSG glutaciona oxidada; GSH Glutaciona reduzida; NADPH nicotinamina adenina dinucleodídeo fosfato reduzida; NADP nicotinamina adenina dinucleodídeo fosfato; Radical Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ); Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); Hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ); Hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ); peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ); óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ); Oxigênio ( $O_2$ ); G6PDH (Glicose 6 fosfato dehidrogenase). Fonte: Ribeiro et al.<sup>(35)</sup>.



A enzima GPx é selênio dependente, possui quatro formas: GPX<sub>1</sub>(oxidoreductora extra celular), GPX<sub>2</sub> (gastrointestinal), GPX<sub>3</sub> (presente no plasma) e GPX<sub>4</sub> (hidroperóxido fosfolipídico).

A enzima GSH participa de outras vias de proteção celular: muitos produtos tóxicos combinam-se com a GSH catalisada pela enzima glutamina transferase, desintoxicando o organismo <sup>(30,53)</sup>, apresentando ação antioxidante, tanto no citosol quanto na membrana citoplasmática <sup>(53,54)</sup>.

A enzima GR age conjuntamente com a GPx, sendo responsável pela regeneração da glutatona à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutatona <sup>(53,54)</sup>.

A atividade enzimática da GPx é um importante componente na proteção contra radicais livres em espécies que utilizam o metabolismo oxidativo, sendo importante para a sobrevivência da célula por catalisar a redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de LOOH<sup>•</sup> <sup>(30,49,53)</sup>.

São descritas na literatura duas isoformas de SOD: uma dependente de cobre e zinco e uma de manganês. A CuZn-SOD, é encontrada no citosol, no espaço intermembranas da mitocôndria e no espaço extracelular e a Mn-SOD está presente na matriz mitocondrial <sup>(31,39)</sup>. A SOD catalisa a conversão do ânion O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> <sup>(30)</sup>. A Mn-SOD remove o ânion O<sub>2</sub><sup>•-</sup> produzido, como resultado da transferência de elétron para o O<sub>2</sub> na cadeia de transporte de elétrons ou pelas enzimas oxidases mitocondriais <sup>(30)</sup>. A CuZn-SOD remove o ânion O<sub>2</sub><sup>•-</sup> oriundo das enzimas oxidases citosólicas ou das enzimas citocromo P450 presentes no retículo endoplasmático das células; alguma CuZn-SOD pode estar presente no núcleo e peroxissomos <sup>(30)</sup>.

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é transformado em H<sub>2</sub>O por meio da ação das enzimas CAT ou GPx. Quando acontece alta produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou deficiência da CAT ou da GPx, o

$H_2O_2$  na presença de íons de ferro ou cobre pode levar à formação do radical  $OH^\bullet$  por meio da reação de Fenton <sup>(30)</sup>.

A CAT é uma hemeproteína que tem especificidade para o  $H_2O_2$ , não atuando sobre peróxidos orgânicos. A CAT é responsável pela degradação do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . Esta enzima encontra-se compartimentalizada nos peroxissomos <sup>(30)</sup> e possui menor afinidade pelo  $H_2O_2$  quando comparada a GPx, dessa forma, ela é mais importante em condições nas quais ocorrem altas concentrações de  $H_2O_2$  <sup>(30)</sup>. Sendo assim, a presença das enzimas SOD e GPx é importante para a manutenção de baixos níveis de radicais livres no SNC (35, 37).

Na mitocôndria, encontram-se as maiores concentrações de antioxidantes, por ser o maior sítio de radicais livres <sup>(31)</sup>.

O sistema de defesa antioxidante secundário consiste nos bloqueadores da etapa de propagação da cadeia radicalar, é formado por compostos fenólicos ou aminas aromáticas, tocoferóis, tocotrienóis, flavonóides e vários antioxidantes sintéticos <sup>(28)</sup>, que efetivamente removem radicais intermediários, como radical peroxila ou alcoxila <sup>(28,37,51)</sup>.

Uma terceira linha de defesa é constituída pelo sistema de reparo do DNA e por enzimas proteolíticas e lipolíticas, que eliminam preferencialmente proteínas ou lipídios modificados oxidativamente <sup>(28,29)</sup>.

Um mecanismo antioxidante relevante para a prevenção de mutações e da carcinogênese é a proteção do DNA. Diversos antioxidantes como o ascorbato, o tocoferol e compostos fenólicos podem proteger o material genético dos efeitos deletérios provocados pelas ERO, ERN e de metais <sup>(17)</sup>.

Halliwell <sup>(54)</sup> reforça que o estresse oxidativo impõe uma adaptação ao organismo por meio de uma regulação forçada do sistema antioxidante, impedindo ou minimizando os danos oxidativos, ou diante da incapacidade do sistema antioxidante ocorrem danos teciduais e morte celular por necrose ou apoptose <sup>(54)</sup>.

## 2.6 Vitaminas Antioxidantes

De acordo com *Institute of medicine* <sup>(55)</sup>, antioxidante alimentar é toda substância presente na dieta capaz de reduzir, significativamente, os efeitos adversos produzidos por espécies reativas, como aquelas de oxigênio e nitrogênio, e que possuem função fisiológica normal no organismo. Dentre os nutrientes antioxidantes podemos destacar a vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis), vitamina C, vitamina A e, como precursor, o beta-caroteno <sup>(56)</sup>.

A vitamina E é componente dos óleos vegetais, constituída pelos tocoferóis e tocotrienóis  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , sendo que o  $\gamma$ -tocoferol é a forma mais prevalente de vitamina E na dieta e o  $\alpha$ -tocoferol, a forma mais biodisponível <sup>(57)</sup>.

A vitamina E atua na interrupção de reações em cadeia de peroxidação lipídica <sup>(57)</sup> e pode ser regenerada por mecanismos não enzimáticos pela vitamina C, e por mecanismos enzimáticos, pela GSH <sup>(58)</sup>. Como possui alta lipossolubilidade, distribui-se pelas membranas lipídicas, constituindo-se na principal defesa das mesmas contra as lesões oxidativas <sup>(28,58)</sup>, e por ser o principal antioxidante da membrana celular, previne a propagação da peroxidação lipídica <sup>(59,60)</sup>.

Estas substâncias agem como doadores de H para o radical  $\text{LOO}^{\bullet}$ , interrompendo a reação radicalar em cadeia. O  $\alpha$  tocoferol suprime e reage com o  $^1\text{O}_2$ , sequestra os radicais  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{OH}^{\bullet}$  podendo, portanto, bloquear a iniciação da peroxidação lipídica <sup>(28)</sup>. Cada tocoferol pode reagir com até dois radicais  $\text{LOO}^{\bullet}$  e, nesse caso, o tocoferol é irreversivelmente desativado. Para que eles não se desativem, necessitam do mecanismo de regeneração sinérgico com o ascorbato nas membranas celulares e com a ubiquinona na membrana mitocondrial <sup>(17)</sup>.

Atualmente, além da sua ação antioxidante, são discutidas as suas propriedades não antioxidantes como: modulação da sinalização celular e da transcrição de genes <sup>(58)</sup>.

Sua deficiência tem sido associada a um aumento da viscosidade das plaquetas do sangue, predispondo à formação de coágulos potencialmente fatais. Assim, a vitamina E previne doenças ateroscleróticas não somente por seu efeito antioxidante, mas também por seu efeito inibidor sobre a proliferação de células musculares lisas e sobre a adesão e agregação plaquetária <sup>(60)</sup>.

Além disso, a vitamina E tem efeito modulador sobre as respostas inflamatória e imune. Em geral, sua deficiência aumenta os componentes da resposta inflamatória e prejudica a imunidade celular e a humoral. Experimentos com animais mostraram que a suplementação com vitamina E aumenta a resistência contra infecções <sup>(60)</sup>. Se estiverem muito altas ou baixas concentrações de vitamina E, os leucócitos diminuem a capacidade de destruir bactérias, devido à inibição da produção de radical  $O_2^{\cdot-}$  durante o *burst* oxidativo das células fagocíticas <sup>(28)</sup>.

A vitamina C desempenha diferentes funções no organismo, através de sua atuação como cofator de enzimas, papel antioxidante, participação no metabolismo iônico de minerais e na produção de neurotransmissores <sup>(59)</sup>.

A interação entre as vitaminas E e C mostra-se pela evidência de que a Vitamina C atua regenerando o protonato de tocoferol do radical tocoferil. Estudos revelam que a combinação sinérgica dessas vitaminas pode remover os radicais livres de forma mais efetiva do que a atuação isolada de cada uma delas <sup>(61)</sup>. No entanto, estudo conduzido por Afolabi *et al.* <sup>(61)</sup> não comprovou o efeito sinérgico dessas vitaminas.

A vitamina C (ácido ascórbico) é considerada o principal antioxidante hidrossolúvel, sua ação pode ser em ERO, ERN,  $^1O_2$  e hipoclorito. Sendo um agente redutor, afeta o potencial redox do organismo. Sua ação antioxidante se dá

em razão de sua capacidade de varrer os RL, reagindo com o ânion radical  $O_2^{\cdot-}$  e um próton para gerar  $H_2O_2$ , ou com o radical  $OH^{\cdot}$  para gerar  $H_2O$  <sup>(62)</sup>.

O ácido ascórbico pode captar os radicais de  $O_2$ , que de alguma forma reagiriam para formar peróxidos lipídicos ( $LOOH^{\cdot}$ ). A vitamina C revela-se capaz de prevenir a peroxidação lipídica e a oxidação do LDL-colesterol, por sua ação sobre o radical  $LOO^{\cdot}$  na fase aquosa, antes deles terem iniciado a peroxidação lipídica, e pela regeneração do  $\alpha$  tocoferol, diminuindo assim a probabilidade de reações deletérias dos radicais nos alvos biológicos <sup>(62)</sup>.

A vitamina C desempenha papéis metabólicos fundamentais no organismo humano, atuando como agente redutor, reduzindo metais de transição (em particular  $Fe^{3+}$  e  $Cu^{2+}$ ) <sup>(62)</sup> presentes nos sítios ativos das enzimas ou em formas livres no organismo. Tendo em vista que a vitamina em questão converte as EROs e ERNs em espécies inofensivas e que seus derivados são pouco reativos, essa age como antioxidante *in vivo*, daí porque muitos autores sugerem a ingestão diária de doses maiores de vitamina C para proteção contra o desenvolvimento de doenças crônicas, cardiovasculares e de alguns tipos de câncer <sup>(17)</sup>.

Os mecanismos de prevenção da peroxidação de lipídios promovido pela mesma vitamina são:

1. De forma preventiva: através da reação com as EROs e ERNs presentes, ou na restauração do equilíbrio redox, doando hidrogênio ao radical lipídio, no plasma <sup>(17)</sup>.
2. Nas membranas celulares, atua em parceria com o  $\alpha$ -tocoferol. O radical livre normalmente abstrai um próton do carbono metilênico alílico, o radical  $L^{\cdot}$  formado rapidamente adiciona o oxigênio tripleto, gerando o radical lipídio-peroxila. Nesta etapa, o tocoferol age doando um hidrogênio para esse radical formando o  $LOOH^{\cdot}$  e o radical tocoferoxila <sup>(17)</sup>.

Neste sentido, Halliwell e Gutteridge <sup>(30)</sup> reforçam as suas propriedades antioxidantes:

- a) remoção do ânion radical  $O_2^{\bullet-}$ ;
- b) remoção de radicais sulfidrilas;
- c) pode reduzir agentes carcinógenos presentes em alimentos em produtos inativos;
- d) remoção de  $^1O_2$  e radical  $OH^{\bullet}$ ;
- e) atua regenerando o  $\alpha$  tocoferol a partir do  $\alpha$  tocoferil.

A vitamina C é importante na cicatrização das feridas, essencial na síntese de colágeno, atuando como co-fator para as enzimas lisil e propil hidroxilases, e atua ainda estimulando a transcrição dos genes do colágeno <sup>(62)</sup>.

Fumeron *et al.* <sup>(63)</sup> reforçam que a vitamina C pode atuar como agente pro-oxidante, evidenciado, em seu estudo, pela elevação dos níveis plasmáticos de DHA (ácido deidroascórbico) e observaram ainda uma tendência de elevação da relação GSSG/GSH (glutaciona oxidada e glutaciona reduzida) em pacientes em diálise. A vitamina C, na ausência de vitamina E, pode mediar reações oxidativas <sup>(63)</sup>.

Halliwell e Gutteridge <sup>(30)</sup> salientam que a vitamina C facilita a absorção intestinal do ferro; se  $H_2O_2$  está presente, o ascorbato pode acelerar a formação de  $OH^{\bullet}$  pela redução de  $Fe^{2+}$  e  $Cu^+$ , misturas de ácido ascórbico e ferro frequentemente são usadas para acelerar a peroxidação lipídica em membranas isoladas <sup>(30)</sup>, no entanto, o efeito pró-oxidante não acontece usualmente *in vivo* porque os minerais Fe e Cu não se encontram disponíveis nos fluidos extracelulares <sup>(30)</sup>.

Fumeron *et al.* <sup>(63)</sup> não evidenciaram mudanças significativas nos marcadores de estresse oxidativo e inflamatório com a suplementação da vitamina C <sup>(63)</sup>. A utilização de doses farmacológicas de vitamina C apresenta-se

como uma interessante e importante terapêutica, em função de sua ação na biossíntese de colágeno e por seu efeito redutor de RL <sup>(62)</sup>.

Estudos observacionais indicam que a ingestão total de antioxidantes ou a ingestão das vitaminas do complexo B, C e E associa-se a menores concentrações de Proteína C Reativa (PCR). Igualmente, maiores concentrações plasmáticas das vitaminas C, E e A e do selênio estão associadas a menores concentrações de PCR e a um menor risco para Síndrome Metabólica (SM) <sup>(64)</sup>. Segundo Huang *et al.* <sup>(42,65)</sup>, a vitamina C ( $p=0,01$ ) mostrou-se capaz de aumentar a capacidade antioxidante total do soro (*serum oxygen radical absorbance capacity - ORAC*), o que não ocorreu com a vitamina E ( $p=0,52$ ). Os autores ressaltam que esse resultado reflete o fato de a vitamina C, ao contrário da E, desempenhar melhor atividade antioxidante em meios hidrofílicos. Dessa feita, foi proposto que a suplementação com vitamina C seria benéfica para reduzir o estresse oxidativo <sup>(28)</sup>.

Muitas vitaminas inibem a produção de NO<sup>\*</sup> a partir do iNOS (óxido nítrico sintetase citocina induzida), reforçando suas ações antiaterogênicas e antineuroinflamatórias <sup>(66)</sup>. A vitamina A inibe a transcrição do gene iNOS em células musculares lisas, endoteliais, miócitos cardíacos, células mesangiais. Além disso, diversos carotenóides suprimem a expressão de iNOS e induzem a síntese de macrófagos ativados <sup>(66)</sup>.

Dentre os carotenóides, o  $\beta$ -caroteno é considerado um antioxidante eficiente na proteção contra os danos oxidativos, uma vez que inibe a peroxidação lipídica e inativa  $^1O_2$  e os radicais LOO<sup>\*</sup> <sup>(67,68)</sup>, OH<sup>\*</sup> e O<sub>2</sub><sup>\*-</sup>. E assim, reduz a oxidação do DNA e lipídios, que está associada a doenças degenerativas, como câncer e doenças cardíacas <sup>(32)</sup>.

A principal atividade antioxidante dos carotenóides é a desativação do  $^1O_2$  <sup>(68)</sup>, com velocidade para essa reação superior à dos tocoferóis. A desativação do  $^1O_2$  pode acontecer de duas formas: pela transferência física da energia de

excitação do  $^1\text{O}_2$  para o carotenóide e pela reação química do carotenóide com o  $^1\text{O}_2$ . Em condições normais no organismo, 95% da desativação do  $^1\text{O}_2$  é física, restando somente 5% para reagir quimicamente, o que torna os carotenóides antioxidantes mais efetivos <sup>(9)</sup>.

A sua ação sequestrante do  $^1\text{O}_2$  interrompe a geração de carotenóides reativos ao oxigênio ainda nas etapas iniciais de sua formação. Tal efeito também vem sendo atribuído mais recentemente ao próprio retinol, do qual alguns carotenóides são precursores. Uma única molécula de retinol ou  $\beta$ -caroteno é capaz de inativar vários radicais  $^1\text{O}_2$  antes de ser destruída. O  $\beta$ -caroteno é ainda reconhecido como varredor de radicais peroxil, especialmente em condições de baixa tensão de oxigênio <sup>(68)</sup>.

As vitaminas C e E podem proteger a pele dos efeitos devastadores do estresse oxidativo, conforme demonstrou Murray *et al.* <sup>(69)</sup>, avaliando a formação de citocinas, incluindo as interleucinas: IL1 $\alpha$ , a IL-6, a IL-8, a IL-10 e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (FNT $\alpha$ ), concluíram que as vitaminas referidas exercem importantes e significativos efeitos fotoprotetores na pele, sendo particularmente eficazes na redução das mutações do dímero de timina, conhecidos por sua associação ao CP.

## 2.7 Zinco e Outros Minerais Antioxidantes

Dentre os nutrientes essenciais para o funcionamento normal do sistema antioxidante endógeno, podem-se citar os minerais como cobre, manganês, zinco, selênio, ferro e a vitamina riboflavina, que são importantes co-fatores do sistema enzimático antioxidante <sup>(56)</sup>.

O selênio é considerado um mineral essencial para a proteção contra a peroxidação lipídica de membranas celulares e subcelulares, uma vez incorporado às selenoproteínas, exerce importantes funções no organismo, participando da defesa antioxidante, do sistema imune e da regulação da função tireoidiana <sup>(70)</sup>. A



GPx é uma selenoproteína que atua como enzima antioxidante no plasma. Demonstrou-se que sua concentração e atividade aumentam com o consumo de selênio, até que essa relação dose-resposta atinja um platô, a um nível sérico de selênio entre 70 e 90 ng/mL <sup>(70,71)</sup>.

Esse mineral bloqueia a ativação do fator NF- $\kappa$ B, um regulador sensível a oxidantes que modula a produção de mediadores inflamatórios e de moléculas de adesão, dessa forma a ativação do fator NF- $\kappa$ B pode ser decorrente de situações de uma baixa ingestão de selênio. Desta forma, esse oligoelemento pode exercer papel fundamental em minimizar o desenvolvimento de doenças crônicas por reduzir a atividade pró-inflamatória e por favorecer o sistema de defesa antioxidante <sup>(70,71)</sup>.

A suplementação de selênio levou a uma diminuição na expressão de dois importantes genes pró-inflamatórios: ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e TNF- $\alpha$ , por meio da inibição de vias relacionadas às proteínas quinase mitogênico ativado (MAPK), sugerindo um efeito anti-inflamatório do selênio por meio da regulação de fatores de transcrição <sup>(64)</sup>.

O cobre tem funções orgânicas específicas por ser constituinte de enzimas com atividade de oxidação e redução, como cobre-zinco SOD, lisil oxidase, citocromo-c oxidase, dopamina  $\beta$ -hidroxilase e ceruloplasmina, entre outras. Influencia diretamente a atividade da superóxido dismutase e ceruloplasmina, as quais requerem o mineral como cofator catalítico e, indiretamente, atua na atividade das enzimas CAT e GPx. Está envolvido no metabolismo ósseo, no sistema imunológico e na prevenção de doenças cardiovasculares <sup>(72)</sup>. A deficiência de cobre pode comprometer direta e indiretamente vários componentes do sistema de defesa antioxidante <sup>(72)</sup>.

O zinco é um elemento essencial de grande importância para o metabolismo humano, que atua desempenhando funções estruturais, enzimáticas e reguladoras <sup>(73,74)</sup>. Sua deficiência contribui para prejuízos nas seguintes funções: replicação do DNA, transcrição de RNA, transdução do sinal, catálise

enzimática, regulação do potencial de oxidação, apoptoses e compromete a defesa imunológica<sup>(74)</sup>.

A participação do zinco na defesa antioxidante plasmática vem sendo mais recentemente estudada. Entre outros efeitos, esse mineral inibe a NADPH-oxidase enzima envolvida na produção de EROs e atua como cofator catalítico SOD, uma das enzimas do sistema antioxidante endógeno. Além disso, participa diretamente da neutralização do radical  $\text{OH}^\bullet$  e induz a produção de metalotioneínas, substâncias que também atuam na remoção desse radical<sup>(27,73,74)</sup>. Através da enzima SOD, o radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pode ser neutralizado com extrema rapidez pela adição de ácidos, originando outro radical, o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o qual também pode ser produzido espontaneamente<sup>(75)</sup>. Se a SOD for ineficiente para reduzir o radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , o acúmulo desse radical pode reagir com o  $\text{NO}^\bullet$  gerando o radical muito tóxico:  $\text{ONOO}^\bullet$  o qual inicia a nitrosilação dos resíduos de tirosina de moléculas protéicas, provocando alteração na função protéica<sup>(75)</sup>.

Um balanço positivo de zinco está associado a melhor retenção nitrogenada; a insulina plasmática aumenta quando um negativo balanço de zinco é convertido em positivo. Adequada provisão de zinco é necessária para estimular a síntese protéica, provavelmente como resultado de um aumento na atividade de muitas enzimas dependentes de zinco que participam na síntese protéica; o zinco também exerce papel na resposta e utilização insulínica<sup>(75)</sup>.

Prasad *et al.*<sup>(76)</sup> referem que após a suplementação de zinco a incidência de infecções diminuiu, as concentrações plasmáticas de zinco aumentaram, a geração de  $\text{FNT}\alpha$  e marcadores de estresse oxidativo reduziram significativamente.

A suplementação de zinco provoca redução na expressão gênica, na produção de citocinas pró-inflamatórias e redução dos marcadores de estresse oxidativo. Em células pró-mielócitos de portadores de leucemia, a deficiência de zinco aumenta os níveis de  $\text{FNT}\alpha$ , IL-8, IL-1b, e mRNA<sup>(77)</sup>.

O zinco e o cobre atuam indiretamente no controle da produção de RL, evitando seus efeitos deletérios. O zinco atua reduzindo a ação oxidante de metais e conferindo estabilidade as membranas celulares por meio da prevenção da peroxidação lipídica; além de que, o efeito protetor do zinco no estresse foto-oxidativo, pode estar relacionado à síntese da metalotioneína, formando um complexo zinco-tiolato, que parece ser alvo preferencial para oxidação, preservando a pele e seus componentes <sup>(73,78)</sup>.

O Zinco pode funcionar como agente antioxidante por dois mecanismos: em primeiro lugar, compete com o Fe e Cu para a ligação com as membranas celulares e proteínas, deslocando-os e tornando-os mais acessíveis para a ligação com a ferritina e metalotioneína respectivamente. Em segundo lugar, o Zn liga os grupos de sulfidrilas nas proteínas, protegendo-as da oxidação. O nível de Zinco não controla diretamente as concentrações de peróxidos do tecido, mas pode proteger moléculas específicas do dano oxidativo e peroxidativo <sup>(73,74,79)</sup>.

Os mecanismos propostos para a atividade antioxidante do zinco são: proteção contra depleção de vitamina E, estabilização de membranas, restrição da produção de radicais livres endógenos, manutenção das concentrações tissulares de metalotioneína e contribuição para a estrutura da enzima antioxidante extracelular superóxido-dismutase <sup>(73,74,78)</sup>.

O zinco participa como cofator de enzimas como: álcool desidrogenase, anidrase carbônica, fosfatase alcalina, carboxipeptidases, proteína C quinase, ácido ribonucléico polimerase, transcriptase reversa e constituinte de proteínas de transcrição <sup>(77)</sup>.

Heidor *et al.* <sup>(79)</sup> salientam que importante papel tem sido atribuído a este mineral na manutenção da estabilidade genômica e na expressão gênica, pois compõe regiões de proteínas denominadas dedos de Zn, necessárias ao reconhecimento das sequências de DNA. Os dedos de Zn são fatores de transcrição que blindam o DNA e regulam a transcrição dos receptores de hormônios esteroides e outros fatores <sup>(75)</sup>. *In vivo*, o mineral revela-se capaz de

renaturar e reativar o p53 em células previamente tratadas com agentes quelantes de metais. Em células de adenocarcinoma, o mineral induz apoptose, mediada pela geração de EROs <sup>(79)</sup>.

Bickers e Athar <sup>(80)</sup> postulam que pacientes com queratoses actínicas e carcinoma basocelular apresentam concentrações das enzimas antioxidantes: CuZnSOD e MnSOD no plasma e soro reduzidos.

Em estudos realizados com ratos que desenvolveram câncer de esôfago induzido por n-nitrosobenzilmetilamina, a suplementação de zinco induziu rapidamente a apoptose de células epiteliais, diminuindo substancialmente o desenvolvimento do câncer <sup>(73)</sup>.

Em estudo conduzido por Kraus *et al.* <sup>(81)</sup>, investigou-se a influência de antioxidantes suplementados (vitamina C, vitamina E ou  $\beta$  caroteno) na fragilidade osmótica, no dano oxidativo e nos componentes do sistema de defesa preliminar dos eritrócitos de ratos zinco-deficientes. Concluindo-se que a deficiência dietética de zinco em ratos causa aumento na fragilidade osmótica dos eritrócitos e dano oxidativo, os quais tendem a melhorar com a suplementação dos antioxidantes.

## 2.8 Biomarcadores do Estresse Oxidativo

A quantificação de biomarcadores pode traduzir mudanças em sistemas biológicos, em resposta à exposição ou aos efeitos de xenobióticos ou outros tipos de fatores promotores de doenças <sup>(43)</sup>, permitindo a avaliação e mensuração de substâncias, cujas concentrações ou níveis em amostras biológicas expõem evidências de processos biológicos normais, processos patogênicos e de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica.

Conforme Bray <sup>(82)</sup>, os métodos de mensuração do estresse oxidativo são baseados em cinco estratégias: medida de produtos gerados por danos oxidativos em amostras biológicas; medida do equilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e

antioxidantes; avaliação da vulnerabilidade de amostras biológicas à oxidação após a adição de um pró-oxidante externo; detecção de eventos primários como ativação de fatores de transcrição que antecedem o dano oxidativo; e abordagem clínica que utiliza métodos não invasivos, como ressonância magnética, para diagnosticar manifestações primárias resultantes do estresse oxidativo.

Segundo Vasconcelos *et al.* <sup>(43)</sup>, o biomarcador ideal deve reunir as seguintes características: mostrar alta especificidade para o efeito de interesse; refletir o efeito desde o início; ser passível de determinação e análise fáceis e de baixo custo; ser analisado por técnica não invasiva, de alta sensibilidade, no fluido biológico escolhido.

Os marcadores de balanço redox não invasivos refletem o dano causado pelas EROs e ERNs sobre o sistema biológico, assim como a eficiência da defesa antioxidante em frear tais danos <sup>(43)</sup>. Os estudos têm utilizado métodos para aferição indireta das lesões oxidativas, entre eles, destacam-se os espectrofotométricos e cromatométricos que medem a atividade enzimática (SOD, CAT, GPx, GSH) e/ou a concentração de tripeptídeos (glutathiona total, GSH, GSSG e aldeídos). Estas aferições podem ser realizadas em tecidos, sangue e outros fluidos <sup>(43)</sup>.

A ação deletéria das ERO e ERN sobre biomoléculas tem como consequência a manifestação de danos oxidativos potenciais. Dessa forma, os biomarcadores do dano oxidativo são classificados de acordo com a biomolécula sobre a qual as espécies reativas atuam: lipídios, proteína ou DNA <sup>(83,84)</sup>.

Muitos desses biomarcadores estão sendo estudados e aplicados em pesquisas epidemiológicas, incluindo várias análises de lipídios, DNA e oxidação de proteínas <sup>(84)</sup>. Torna-se relevante identificar os marcadores de estresse oxidativo e sistematizar sua utilização no diagnóstico e controle dos efeitos adversos desse estresse <sup>(83,84)</sup>.

Os indicadores de peroxidação lipídica têm sido propostos como sendo eficazes para investigação do estresse oxidativo, destacando-se os métodos: *xilenol-orange* usado para se determinar a concentração de LOOH<sup>\*</sup> em amostras biológicas, <sup>(85)</sup>; a quantificação do MDA pela reação clássica do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e a dosagem de isoprostano <sup>(84)</sup>.

A validade de um biomarcador de estresse oxidativo / nitrosativo apresenta os seguintes requisitos: (a) estabilidade, não ser suscetível a oxidação ou perda durante o manuseio da amostra, processamento, análise, armazenamento e, (b) um produto de grande dano oxidativo / nitrosativo que podem estar implicados diretamente no início e / ou a progressão da doença, (c) acessível num tecido alvo ou em um substituto válido e que reflete quantitativamente a modificação oxidativa do tecido alvo, (d) estando presente em concentrações suficientemente altas (e) específico para as espécies reativas em questão e livre de fatores de confusão relativo ao consumo alimentar, (f) não invasivos, (g) mensuráveis através de um ensaio específico, sensível e reproduzível; (h) fácil de detectar e mensurável entre as populações; (i) apresentar-se, em concentrações que não variam amplamente nas mesmas pessoas nas mesmas condições em diferentes ocasiões <sup>(86,87)</sup>.

O método FOX baseia-se no princípio de que os hidroperóxidos oxidam ferro II a ferro III, o qual reage com o *Orange xilenol*, produzindo um cromóforo que tem absorção máxima em 560 nm <sup>(85)</sup>. O método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por quimiluminescência tem sido bastante utilizado na mensuração específica de LOOH<sup>\*</sup> os quais são os primeiros produtos da peroxidação lipídica a se formarem <sup>(85)</sup>.

O conteúdo ou acúmulo de LOOH<sup>\*</sup> em uma amostra pode ser quantificado usando técnicas espectrofotométricas, onde o produto da reação dos hidroperóxidos com reagentes como FOX, pode ser quantificado. O resultado pode ser expresso em uma razão LOOH<sup>\*</sup>/concentração de colesterol na amostra <sup>(85)</sup>. Para quantificar os hidroperóxidos, utiliza-se a reação dos hidroperóxidos com um sistema enzimático de GPx/GSH e NADPH. São feitas

duas medidas de absorvância em 340 nm, uma anterior a reação e uma posterior, visando determinar o decréscimo da absorvância, devido à oxidação do NADPH, neste comprimento de onda; este método é amplamente utilizado, quando se pretende avaliar indiretamente a oxidação da LDL em diversas amostras biológicas<sup>(85)</sup>.

O método para quantificação de MDA como marcador de peroxidação lipídica se baseia na reação clássica do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo colorido, de absorvância máxima no comprimento de onda de 532 nm. A técnica espectrofotométrica é a mais empregada para determinar a concentração de MDA em amostras biológicas<sup>(83, 84)</sup>.

O ensaio para quantificação de TBARS é um ensaio espectrofotométrico simples que mede um cromogênio que é produzido pela reação do ácido TBA, com MDA, que é um produto final da peroxidação lipídica. A utilização de espectrofotometria para dosagem de TBARS é extremamente fácil de usar, mas não é específica na medida em que muitos outros substratos (por exemplo, aldeídos) podem reagir com o ácido tiobarbitúrico, tornando tal método obsoleto. Em vez disso, a maioria dos pesquisadores recorrem a uma modificação do método TBARS, usando espectrofotometria líquida de alta eficiência (HPLC) para separar TBARS e MDA<sup>(84,85)</sup>.

Outros produtos podem ser quantificados para determinar a magnitude da oxidação lipídica em amostras biológicas, além de MDA e hidroperóxidos lipídicos. Este é o caso dos F2-Isoprostanos, compostos derivados da ação de RL sobre os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA). A subclasse F2- isoprostano são produtos da oxidação do ácido araquidônico, outros isoprostanos (F4-isoprostano) são derivados dos ácidos eicosapentaenoicos (EPA) e docosaheptaenóico (DHA). Entre eles, o mais abundante é o PGF2-alfa-8-isoprostano (8-iso-PGF2 $\alpha$ )<sup>(84)</sup>, que atualmente é considerado um método específico para determinar a peroxidação lipídica<sup>(84,85,86)</sup>.

Os F2-Isoprostanos podem ser extraídos e quantificados utilizando extração de fase sólida, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (CG-EM) <sup>(86,87,88)</sup>. Os radioimunoensaios (*radioimmunoassays* – RIA), os imunoensaios enzimáticos (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – ELISA) representam outras técnicas empregadas para sua quantificação. A aplicação de técnicas imunológicas, na aferição de 8-iso-PGF2 $\alpha$  (tipo de isoprostano), tem limitada especificidade, decorrente das possíveis reações cruzadas com outros prostanóides <sup>(47,86,87)</sup>. A CG-EM tem boa especificidade, no entanto requer instrumentação analítica e analista treinado <sup>(88)</sup>, é o método analítico de referência para a aferição dos isoprostano em fluídos biológicos e tecidos <sup>(83,87,88)</sup>.

Inicialmente, os isoprostanos são formados *in situ* esterificados pelos fosfolipídios da membrana celular e depois liberados para os fluidos biológicos pela fosfolipase <sup>(87)</sup>. Ao contrário do que ocorre com os LOOH (produtos primários da peroxidação lipídica - LPO), que se decompõem rapidamente nos fluídos e tecidos humanos, F2-isoprostanos são produtos secundários da peroxidação lipídica, quimicamente estáveis, podendo, inclusive, ser dosados na urina <sup>(42,43,86,87)</sup>.

A quantificação de F2-isoprostanos apresenta várias vantagens sobre outros marcadores quantitativos do estresse oxidativo: 1) são quimicamente estáveis, 2) são produtos específicos de peroxidação, 3) são formados *in vivo*, 4) estão presentes em quantidades detectáveis em todos os tecidos normais e fluidos biológicos, 5) aumentam substancialmente em modelos animais de lesão oxidante, 6) não são afetados pelos teores de lipídios na dieta, e 7) podem fornecer uma base bioquímica sensível em estudos de determinação da dose com antioxidantes <sup>(87)</sup>.

A medida de dienos conjugados permite avaliar a oxidação lipídica através do acompanhamento da cinética da reação de sua formação durante a oxidação



da LDL, monitorando continuamente a mudança na absorbância da amostra no comprimento de onda de 234nm <sup>(88)</sup>.

Para iniciar o processo de oxidação, utiliza-se a incubação da LDL com íons de metais de transição como o cobre. O tempo transcorrido entre a adição dos íons e o início da formação dos dienos é chamada fase lag, inferindo-se a susceptibilidade de oxidação da LDL pela duração dessa fase <sup>(88)</sup>.

O DNA pode ser oxidado produzindo muitos danos oxidativos, contudo a oxidação do C-8 da guanina é um dos eventos mais comuns e resulta em uma lesão mutagênica, que produz a transversão da base guanina para timina. O 8-OHdG pode ser medido em amostras de DNA humano (linfócitos, placenta, e outros) e na urina; e é considerado um importante marcador de risco de câncer associado ao estresse oxidativo. Vários métodos para a quantificação desse marcador estão disponíveis: HPLC (cromatografia líquida de alta pressão) com detecção eletroquímica, CG/EM e imunoenaios enzimáticos (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – ELISA) <sup>(84)</sup>.

As proteínas também reagem com as EROs, portanto, torna-se importante a análise da oxidação deste componente molecular. Os marcadores propostos para análise da oxidação protéica são os grupos tióis protéicos e os grupos carbonilas plasmáticos. Todos os aminoácidos são susceptíveis à oxidação, principalmente os aromáticos, que são os alvos preferidos de ataque dos radicais livres. Uma das principais consequências desse ataque sobre as proteínas são as modificações em aminoácidos, como: metionina sulfoxida, valina hidroxida, 2-oxohistidina, peróxido de proteínas, hidroxilação de tirosina para gerar o 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA) <sup>(89,90)</sup>.

O grupo carbonílico é amplamente utilizado como marcador do dano oxidativo em proteínas sob estresse oxidativo <sup>(43,90)</sup>. O método mais conveniente para a quantificação do grupo carbonílico é o espectrofotométrico <sup>(89,90)</sup>, baseado na reação de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DTNB) com o grupo carbonila <sup>(92)</sup>, cuja

leitura de absorvância é feita a 360 nm <sup>(43)</sup>. A concentração de carbonila é calculada usando o coeficiente de extinção molar de 22,000 <sup>(90)</sup>. A unidade mais utilizada para carbonila é nmol/g de proteína, por isso é preciso quantificar a proteína total da amostra <sup>(43)</sup>.

Este método não requer elevados custos e equipamentos especializados, apresenta a desvantagem de não medir a extensão do dano oxidativo da proteína na mistura de plasma, tecidos homogêneos ou extratos celulares. Requer mais proteína disponível em amostras clínicas <sup>(89,90)</sup>.

As concentrações do grupo carbonila das proteínas mostram-se elevadas com o avançar da idade, assim como em doenças inflamatórias crônicas, fibrose cística, injúria isquemia-reperfusão <sup>(89)</sup>. Tais concentrações diferem significativamente entre crianças saudáveis e portadores de doenças renais crônicas, e o seu uso como biomarcador de estresse oxidativo é mais específico em pacientes com diabetes e hipercolesterolemia <sup>(89,90)</sup>.

Os biomarcadores baseados no dano oxidativo das proteínas têm grande relevância em função de que podem sinalizar para: alteração funcional de enzimas, receptores, proteínas transportadoras, resposta imune, entre outros. Por meio de tais alterações, os produtos decorrentes do dano oxidativo sobre as proteínas podem contribuir para a geração de danos secundários a outras biomoléculas. O dano ao DNA pode ser irreversível em decorrência da alteração funcional das enzimas reparadoras <sup>(89,90)</sup>.

Para a análise dos antioxidantes, alguns autores defendem o estudo da capacidade antioxidante total (CAOT), ao invés de análise de antioxidantes isolados, principalmente devido à interação que existe entre eles no plasma ou soro <sup>(43)</sup>. A análise da CAOT, permite uma visão ampla da ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes; obtendo-se um parâmetro integrado capaz de dimensionar pequenas alterações no delicado equilíbrio redox existente *in vivo*.

Essa análise auxilia na avaliação dos fatores nutricionais, fisiológicos e ambientais do balanço redox em seres humanos. <sup>(43)</sup>.

Entre os ensaios por meio dos quais se afere a capacidade antioxidante total de fluidos biológicos, destacam-se o TAS (*Total Antioxidant Status*) e o TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) <sup>(91)</sup>. O TAS permite estimar, *in vitro*, a capacidade de todos os antioxidantes presentes no soro ou plasma em inibir a geração de radicais livres. Da mesma forma, o TEAC é empregado para avaliar, *in vitro*, a capacidade antioxidante total do soro ou plasma, medindo-se a capacidade dos antioxidantes presentes na amostra de interesse em inibir a oxidação do composto ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonete]. A quantidade de ABTS oxidado (ABTS•+) é monitorada por leitura espectrofotométrica, cuja absorbância pode ser medida em um comprimento de onda de 405nm ou 750nm. Assim, a supressão de tal absorbância é diretamente proporcional à quantidade de antioxidante presente na amostra <sup>(91,92,93)</sup>.

A avaliação do sistema de defesa também pode ser realizada pela determinação da atividade enzimática antioxidante (atividade enzimática da CAT, da SOD e da GPx) <sup>(43)</sup>. Para a análise de SOD verifica-se indiretamente a atividade de SOD, geralmente por adição ao eritrócito do sistema xantina - xantina oxidase como fonte de  $O_2^{\cdot-}$  e um composto que seja reduzido pelo  $O_2^{\cdot-}$  <sup>(43)</sup>, sendo a atividade da enzima medida a partir do grau de inibição da reação do eritrócito, expressos em unidades por grama de hemoglobina (Hb) (U/g Hb) <sup>(43)</sup>.

Para o estudo da atividade da enzima CAT recorre-se à determinação da redução da concentração de  $H_2O_2$  e da produção de  $O_2$ ; a leitura da redução de  $H_2O_2$  é feita por espectrofotometria ultravioleta a 240 nm. Os valores de CAT também são expressos em unidades por g de hemoglobina (U/gHb). Uma unidade de CAT corresponde à atividade da enzima necessária para o consumo de 1  $\mu$ mol de  $H_2O_2$  em 1 minuto <sup>(43)</sup>.

Um dos métodos para avaliar a atividade de GPx em eritrócitos consiste em adicionar ao lisado de hemácias uma mistura contendo NADPH, GSH, GR, EDTA (agente quelante que tem também a função de impedir a oxidação de GSH a GSSG) e tampão fosfato. Uma alíquota da mistura é adicionada ao hemolisado, mantido em banho-maria a 37°C durante 1 min, adicionando-se, em seguida, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou hidroperóxido orgânico, para iniciar a reação, que é acompanhada em espectrofotômetro <sup>(43)</sup>. A análise de GR em eritrócitos é feita utilizando-se técnicas espectrofotométricas, em valores de absorbância de 340nm, quando o NADPH é convertido em NADP<sup>+</sup> <sup>(43)</sup>.

## 2.9 Estresse Oxidativo e Câncer

Reforça-se, por oportuno, que o envolvimento celular e molecular de EROs, ERNs e cloro no desenvolvimento de doenças está cada vez mais consolidado <sup>(91)</sup>.

Há evidências do envolvimento de EROs na regulação de inúmeras vias de sinalização que controlam processos biológicos importantes <sup>(94)</sup>, incluindo a migração, diferenciação, proliferação, apoptose, adaptação ao estresse e a expressão gênica. As EROs podem modular múltiplos sinais de transdução por ativação de receptores do fator de crescimento, a ativação de genes relacionados com o crescimento precoces tais como c-fos e c-jun, alterações nas atividades de proteínas quinases, inativação oxidativa de fosfatases e ativação de fatores de transcrição <sup>(94)</sup>. Além disso, atuam como mensageiros das vias de sinalização intracelular das células inflamatórias, por exemplo, através da ativação do FNT $\alpha$ , IL 1 <sup>(31)</sup> e do fator NF kappa  $\beta$ , induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo bloqueada por vários antioxidantes, inclusive a vitamina E <sup>(32,43,47)</sup>.

A estreita associação entre estresse oxidativo e câncer origina-se, em parte, pelos efeitos da radiação ionizante, a qual produz radicais livres de Oxigênio e a 8-oxi-8- hydroxy-2 deoxiguanosina (8-OHdG) <sup>(11)</sup>, cuja presença no DNA

provoca a transversão da guanina para timina <sup>(95)</sup>. O aumento da concentração de 8-OHdG poderia levar a aumento da instabilidade genômica que, por sua vez, pode levar a um comportamento fenotípico mais maligno dos tumores <sup>(95)</sup>.

O estresse oxidativo se associa com a iniciação, promoção e progressão da carcinogênese; Nishigori *et al.* <sup>(11)</sup> reiteram que tanto a radical OH<sup>\*</sup> quanto o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> podem induzir danos ao DNA o qual representa a etapa inicial do processo de carcinogênese <sup>(11,80,96)</sup>.

As EROs geradas no ambiente intracelular podem produzir diretamente alterações em uma fita ou na dupla fita de DNA, oxidando as bases pirimidinas, purinas, e desoxirriboses, levando à mutagênese <sup>(95,96)</sup>.

É sabido que o aparecimento de mutações no DNA celular, promovidas por agentes patogênicos (radicais livres, toxinas, metais, fontes energéticas, etc), pode desencadear a perda do controle na proliferação celular, tendo como consequência um fenótipo celular oncogênico <sup>(95,96)</sup>. Agentes mutagênicos se ligam quimicamente ao DNA, alterando a expressão gênica <sup>(97,98)</sup>. O mecanismo da carcinogênese envolve a hipótese da expansão clonal de células com mutação de oncogenes e gene supressor do tumor, os quais têm crucial papel no controle do ciclo celular, manutenção da integridade dos genes, proliferação e diferenciação celular <sup>(10)</sup>.

### **2.9.1 Estresse Oxidativo e Câncer de Pele**

A produção incontrolada de EROs/ERNs está envolvida na patogênese da neoplasia cutânea <sup>(95,97,98)</sup>. O padrão de pele com câncer cutâneo exhibe aumento nos produtos de lipoperoxidação e decréscimo nas enzimas antioxidantes, e a desregulação oxidativa está frequentemente associada com a progressão do câncer em modelos animais. Tais observações dão suporte ao papel das

radiações UV como pró-indutoras do estresse oxidativo e danos celulares, contribuindo para a patogênese do câncer cutâneo <sup>(95,96)</sup>.

As EROs/ERNs são geradas como resultado do aumento do metabolismo das células transformadas, de uma reação imunológica contra o tumor em desenvolvimento, da radiação ultravioleta, da produção de melanina e de um sistema antioxidante alterado <sup>(96)</sup>.

Melo *et al.* <sup>(94)</sup> reiteram que o aumento dos níveis de ERO nas células tumorais é influenciada por inúmeros fatores, tais como interrupção das vias de sinalização, expressão alterada de fatores de transcrição, desregulamentação das enzimas antioxidantes, disfunção mitocondrial, acelerado metabolismo das células neoplásicas, a alteração na proliferação e à aquisição do fenótipo metastático.

Para exercer seus efeitos biológicos, a RUV é transmitida através das camadas de pele e absorvida por moléculas (cromóforo, fotossensibilizador). Então uma série de reações biológicas são iniciadas. A RUV induz danos através de dois mecanismos diferentes: por absorção direta dos fótons por cromóforos que podem conduzir a reações foto-induzidas; este tipo de lesão é típica de bases de DNA. O segundo mecanismo inclui processos de fotossensibilização, onde sensibilizadores endógenos ou exógenos absorvem RUV. Absorvendo a energia dos fótons muda a distribuição dos elétrons nas moléculas de cromóforos / fotossensibilizador e gera o oxigênio singlete. Neste estado, a molécula pode emitir fluorescência, perder energia na forma de calor, e é submetida a uma reação fotoquímica para formar fotoprodutos, ou mudar para o estado triplete excitado. Reações fotobioquímicas, dependendo da espessura da epiderme, da concentração e a distribuição de cromóforos, provocam alterações nas células e tecidos biológicos <sup>(97)</sup>.

A RUV também induz danos ao RNA e pode causar mudanças na estrutura e na expressão de genes, provocando ainda alteração funcional nas proteínas. Além disso, induz bloqueio da transcrição do RNA devido a formação de

fotoprodutos do DNA, conduz à ativação da proteína p53, que induz à apoptose de queratinócitos sujeitos à irradiação <sup>(97)</sup>.

A RUVB media dano celular, principalmente através da liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), provoca danos estruturais ao DNA, particularmente induz a produção de dímeros de ciclobutano de pirimidina (CPD), fotoprodutos, pirimidina- pirimidona entre as bases de pirimidina adjacentes na mesma cadeia que induzem mutações nas células epidérmicas e, associa-se ao câncer de pele <sup>(10,97,98)</sup>.

A RUVB revela-se mais potente na indução do câncer de pele, os seus efeitos decorrem da alteração na estrutura molecular, desregulação da expressão gênica por meio de sinais intracelulares de transdução, contribuindo para o desenvolvimento e progressão do câncer. A RUVB promove supressão imunológica, reduz a tolerância a antígenos, reduz as concentrações dos antioxidantes da pele, dessa forma reduz a capacidade da pele de se defender dos efeitos da radiação solar. A RUVB é mais citotóxica e mutagênica que a RUVA <sup>(97)</sup>.

A RUVA induz modificações na resposta celular, mediada indiretamente por processos oxidativos iniciados por fotossensibilização endógena; induz à geração de EROs, os quais podem mediar danos estruturais no DNA e peroxidação lipídica <sup>(98)</sup>, promovem impacto negativo no sistema imune e também contribuem para o desenvolvimento de câncer <sup>(97)</sup>. As RUVA são mais efetivas em induzir inflamação cutânea que as RUVB <sup>(97)</sup>, envolvendo-se com outras respostas biológicas, como: imunossupressão e modificações oxidativas nas proteínas.

Persistente estresse oxidativo pode causar ativação de fatores de transcrição e protooncogenes como c-fos e c-jun e instabilidade genética <sup>(98)</sup>. Yadav e Sharma <sup>(99)</sup> descobriram que o tempo de exposição à RUV influencia diretamente na magnitude dos danos ao DNA e na apoptose das células. E reforçam que a superexposição à luz solar aumenta o risco de CP e está envolvida

em outras respostas específicas da pele: eritema, imunossupressão e melanogênese, provocando uma série de eventos moleculares: danos ao DNA, indução do gene p53 e proteínas reguladoras de gene p53, distúrbios quanto à replicação e reparo do DNA e apoptose, devido as mutações do gene p53 <sup>(100)</sup>.

As células, contendo mutações do gene p53, são mais resistentes à apoptose, o que desponta como vantagem de crescimento, e podem se expandir preferencialmente de forma clonal, às custas dos queratinócitos normais <sup>(100)</sup>. Bickers e Athar <sup>(80)</sup> mostram que as RUV alteram o ciclo celular, induzindo alterações nos queratinócitos epidérmicos, semelhantes àsquelas induzidas pelas ERO/ERN; induzem apoptose em queratinócitos, alterando a permeabilidade da membrana, mantendo o estado pró-inflamatório na pele <sup>(80)</sup>.

Os radicais livres conduzem a ativação da proteína quinase mitógeno-ativada (MAPK), sendo as mais importantes: ERK 1/2 (quinase reguladora extracelular), JNK (c-jun N-terminal quinase), p38 quinases e IKK (inibitória Kappa quinase) <sup>(97)</sup>. ERK1/2 e JNK são importantes para o recrutamento de c-Fos e c-Jun para o núcleo, onde estes ativam o fator de transcrição AP-1; a ativação da p38 quinase MAPK e IKK são eventos importantes para a ativação do fator NF-kB, ambos são importantes na regulação de genes envolvidos na patogênese da inflamação, como: iNOS e COX-2 <sup>(80)</sup>.

A MAPK regula a transdução da ERK 1/2, JNK, p38 MAPK. As ERK 1/2 são frequentemente ativadas por fatores de crescimento, e a JNK participa na sinalização de fatores de crescimento, em resposta a eventos geradores de estresse oxidativo, como: exposição à RUV e a ação de citocinas inflamatórias <sup>(10)</sup>. O <sup>1</sup>O<sub>2</sub> pode iniciar a sinalização de JNK, a qual induz, por meio da collagenase intersticial, a síntese de mediadores inflamatórios, como as citocinas: IL 1 e IL 6 <sup>(80)</sup>.

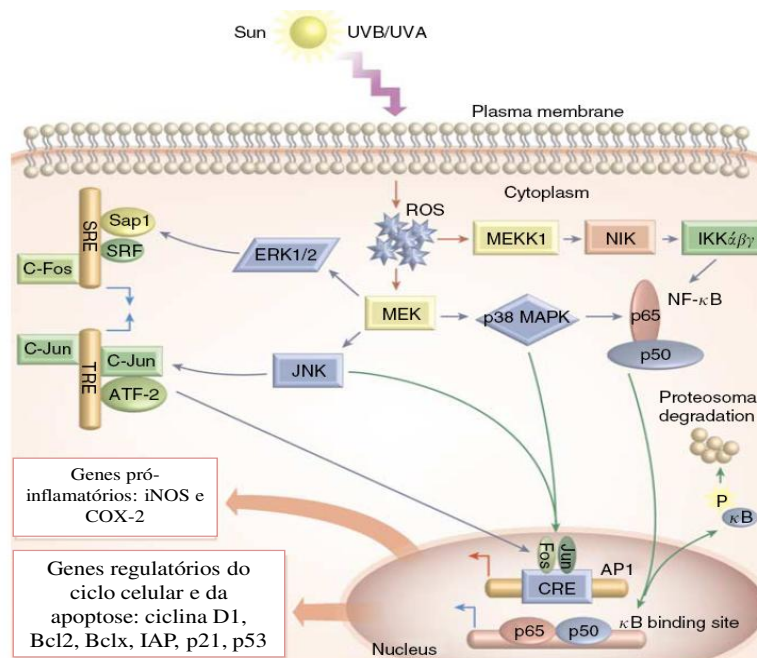
A AP-1, cuja produção pode ser induzida pelas EROs e ERNs, estimula a transcrição de genes de enzimas desintegradoras da matriz, como às



melanoproteinases da matriz (MMP), nomeadamente são: MMP 1, MMP3, MMP9. A MMP1 cliva os colágenos tipo I e tipo III da pele, preparando-os para serem degradados pelas MMP3 e MMP9, agravando a degradação das proteínas, do tecido conjuntivo da matriz e pode aumentar a agressividade biológica ao câncer de pele<sup>(80)</sup>.

O NFκβ ativado, por sua vez, estimula citocinas pró-inflamatórias como: TNF α e a Interleucina-1β (IL-1 β), e parece desempenhar importante papel na regulação redox, o que sugere a necessidade de antioxidantes para sua inativação<sup>(97)</sup>. O preciso mecanismo de ativação do NFκβ pela RUV envolve a inibição do Iκβα (Iota kappaβ alpha), um regulador negativo do NFκβ, e a indução de um receptor para o TNF α<sup>(97)</sup>.

A figura 4 demonstra a ação da RUV sobre a pele.



**Figura 4. Ação da RUV sobre a pele.** ERK (quinase reguladora extracelular), MAPK (proteína quinase mitógeno-ativada), MEK1 e MEK2 (intermediárias da cascata de produção da proteína quinase mitógeno-ativada), NIK (N terminal quinase inibitória), IKK (inibitória Kappa quinase), NFκβ (Fator nuclear κβ), JNK (de c-jun N-terminal quinase), p38MAPK (p38 proteína quinase mitógeno-ativada), cjun e cfos (fatores de transcrição e protooncogenes), iNOS (gene pro-inflamatório), COX-2 (ciclooxigenase), AP1 (fator de transcrição- Proteína Ativadora 1). Fonte: Bickers e Athar<sup>(80)</sup>.

A peroxidação lipídica (LPO), provocada pelos RL, altera a permeabilidade da membrana <sup>(43)</sup>. Durante esse processo, os radicais LOOH<sup>\*</sup> e outros produtos de fragmentação, que são agentes oxidantes, são formados. A LPO leva à destruição de estrutura da membrana celular, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular <sup>(85)</sup>. Durante a LPO, as enzimas COX-2, em condições fisiológicas, são as maiores produtoras de LOOH<sup>\*</sup> <sup>(85)</sup>, e catalisam a produção de prostaglandinas, que em associação com a produção de NO<sup>\*</sup> provoca inflamação, tumores benignos, queratose solar (SK), os quais podem evoluir para a formação de CEC, provavelmente porque as células inflamatórias produzem ERO, aumentando assim o dano oxidativo ao DNA e ao sistema imunológico <sup>(97,100)</sup>.

Mutações no gene p53 em humanos estão frequentemente associadas em mais de 90% dos casos de CEC e em torno de 50% dos casos de CBC <sup>(10)</sup>. A 8-OHdG é uma das principais alterações mutagênicas no DNA induzidas por estresse oxidativo. Elevadas concentrações de 8-OHdG têm sido considerados como fator prognóstico independente em diferentes tipos de câncer <sup>(101)</sup>. Várias enzimas, tais como 8 oxoguanine DNA-glicosilase 1 desidrogenase (hOGG1) e glicose-6-fosfato (G6PD), atuam como proteção contra o estresse oxidativo. A baixa atividade dessas enzimas tem sido consistentemente associada com maior risco de progressão em vários tipos de tumor <sup>(101)</sup>.

Mutações no gene p53 em humanos estão frequentemente associadas em mais de 90% dos casos de CEC e em torno de 50% dos casos de CBC <sup>(10)</sup>. A 8-OHdG é uma das principais alterações mutagênicas no DNA induzidas por estresse oxidativo. Elevadas concentrações de 8-OHdG têm sido considerados como fator prognóstico independente em diferentes tipos de câncer <sup>(101)</sup>. Várias enzimas, tais como 8 oxoguanine DNA-glicosilase 1 desidrogenase (hOGG1) e glicose-6-fosfato (G6PD), atuam como proteção contra o estresse oxidativo. A

baixa atividade dessas enzimas tem sido consistentemente associada com maior risco de progressão em vários tipos de tumor <sup>(101)</sup>.

Com a exposição da pele às RUVs desenvolve-se a inflamação, favorecida pela infiltração de leucócitos e neutrófilos, aumento dos níveis de NO<sup>\*</sup> e prostaglandinas, <sup>(94)</sup>, liberação de mediadores como: FNT $\alpha$ , FN Kappa  $\beta$  e citocinas inflamatórias IL1 $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IL 6<sup>(80,94)</sup>.

Berhane *et al.* <sup>(102)</sup> concluíram que a inflamação está associada à progressão da ceratose actínica para CCE. Com a inflamação, há uma perda gradual da diferenciação, levando à malignidade <sup>(102,103)</sup>. As citocinas produzidas pelos leucócitos inflamatórios podem induzir crescimento, motilidade ou neovascularização tumoral <sup>(102)</sup>. Acredita-se que as prostaglandinas tenham participação no desenvolvimento e progressão de alguns tipos de câncer. O aumento na síntese de prostaglandinas como a PGE2 pela COX-2 provoca a redução da resposta imune do hospedeiro, dificultando assim a eliminação de células neoplásicas. Ocorre inibição da atividade de células T, “natural killer” e macrófagos, da produção de anticorpos e citocinas <sup>(104)</sup>. Os danos do DNA provocam depleção das células de Langerhans da epiderme, interferindo na capacidade de reconhecimento dos antígenos <sup>(94)</sup>.

O gene supressor tumoral conhecido como patched (PTCH) tem sido implicado no desenvolvimento do CBC; mutações esporádicas do PTCH foram encontradas em indivíduos com CBC, alguns dos quais são dependentes de RUV<sup>(100,101)</sup>.

O estresse oxidativo pode provocar o aumento da elastina no RNA mensageiro, pode modificar as proteínas, gerando carbonilas, as quais se acumulam na derme papilar da pele exposta ao dano gerado pela irradiação solar. Adicionalmente, a melanogênese pode ser estimulada pelo dano no DNA <sup>(97)</sup>. Como consequência, pode suprimir a função imune da pele. Aproximadamente 40% dos seres humanos são suscetíveis à imunossupressão provocada pelos

raios UV, e praticamente todas as pessoas com CBC ou CEC apresentam imunossupressão <sup>(97)</sup>.

A imunossupressão desenvolve-se pela supressão do indutor do supressor das Células T, através de células de Langerhans danificadas ou macrófagos inflamatórios, que penetram na pele após exposição a RUV. Outro mecanismo parece ser a liberação de citocinas como a IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , que podem suprimir o sistema imunitário e evitar resposta celular mediada, estas são secretadas pelos queratinócitos, após dano oxidativo. Além disso, a RUV pode também converter cromatóforos normais da pele em agentes imunossupressores, tais como a conversão de ácido trans-urocânico a ácido cis-urocânico <sup>(96,100)</sup>.

Dada a crescente população de sobreviventes de câncer, a necessidade de atenuar ou tratar os efeitos tardios da RUV tem emergido como uma área principal de investigação em biologia de radiação. As vias molecular, celular e bioquímica responsáveis pela morbidade tardia induzida pela radiação são impulsionadas, em parte, por um estresse oxidativo crônico, com aumento crônico de espécies reativas de oxigênio / nitrogênio, que servem como sinalização intracelular responsável pela alteração funcional das células / fenótipo, resultando em inflamação crônica, disfunção orgânica, e fibrose e / ou necrose mais tardias <sup>(105)</sup>.

Neste cenário, torna-se fundamental que recursos e esforços sejam direcionados no sentido de programar estratégias de prevenção e controle de câncer de pele. O estabelecimento de medidas efetivas para o controle do câncer de pele pressupõe informações de qualidade sobre os seus fatores determinantes e acesso aos avanços tecnológicos aplicados à sua prevenção e tratamento.

Torna-se importante avaliar o estresse oxidativo, recorrendo-se à quantificação de seus marcadores em pacientes com prévio diagnóstico dessa patologia, com vistas a vislumbrar estratégias terapêuticas aptas e eficazes para interromper ou atenuar esse estresse oxidativo, para assim, prevenir a instalação deste ou melhorar a qualidade de vida dos doentes. Sinalizando como estratégia

preventiva a suplementação de vitaminas e minerais antioxidantes na tentativa de proteger a pele dos danos oxidativos.



### 3. OBJETIVOS







### **3.1 Objetivo Geral**

Comparar o estresse oxidativo de indivíduos que tiveram e não tiveram câncer de pele não melanoma e avaliar o efeito da suplementação combinada de vitaminas C, E e mineral Zinco no estresse oxidativo de indivíduos que apresentaram a doença.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar os marcadores de estresse oxidativo dos sujeitos que tiveram e não tiveram câncer de pele não melanoma;
- Avaliar os marcadores de estresse oxidativo dos sujeitos que tiveram câncer de pele não melanoma após a suplementação de nutrientes antioxidantes (vitamina C – hidrossolúvel; Vitamina E – lipossolúvel; e zinco – mineral co-fator de enzimas antioxidantes - intracelular);
- Relacionar a suplementação combinada de nutrientes antioxidantes com o perfil oxidativo dos grupos suplementado e placebo;
- Avaliar o estado nutricional dos sujeitos;
- Verificar o consumo alimentar habitual relativo a nutrientes antioxidantes dos sujeitos;
- Correlacionar os marcadores de estresse oxidativo com os parâmetros antropométricos dos sujeitos;
- Identificar os fatores de risco para o câncer de pele.



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**





O estudo foi dividido em duas fases.

A fase 1 foi estudo transversal com controles, cuja população foi constituída por pessoas saudáveis e por indivíduos que apresentaram câncer de pele não melanoma já submetidas a tratamento cirúrgico, atendidas na Clínica Dermatológica do Hospital Getúlio Vargas (HGV) em 2011 em Teresina–Piauí.

A fase 2 foi um estudo do tipo ensaio clínico randomizado, duplo cego, cuja população caso foi constituída por pessoas que apresentaram câncer de pele não melanoma já submetidas a tratamento cirúrgico, atendidas na Clínica Dermatológica do Hospital Getúlio Vargas (HGV) em 2011 em Teresina–Piauí;

A Figura 5 mostra os desenhos dos estudos realizados neste trabalho.

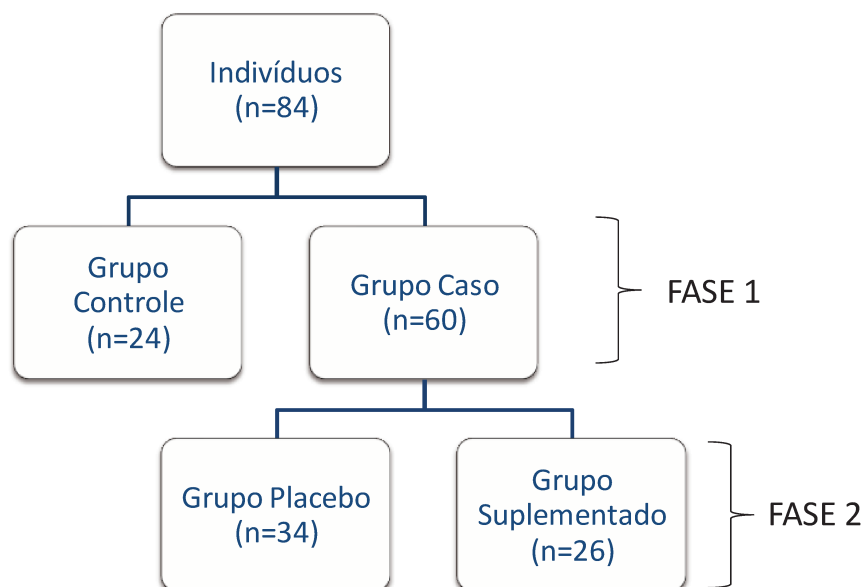


Figura 5. Desenho dos estudos realizados neste trabalho.

#### 4.1 População e Amostra

O grupo controle (GC) foi constituído por 24 (vinte e quatro) pessoas saudáveis, recrutadas na Universidade Federal do Piauí através de chamada em cartazes espalhados pela Universidade, no período compreendido entre os meses de novembro e dezembro de 2012.

Os indivíduos que integravam o grupo caso (GC; n = 60) foram atendidos na Clínica Dermatológica do HGV no ano de 2011, cujos resultados de biópsia evidenciaram diagnóstico de CBC/CEC e foram submetidos a procedimento cirúrgico com vistas à remoção da lesão cutânea. O tamanho da amostra foi estimado com base na prevalência de CBC e CEC de 8,1% <sup>(106)</sup> e o número de atendimentos na Clínica Dermatológica do hospital no ano de 2011, que totalizou 130 portadores dessa patologia residentes em Teresina. Foi adotado o procedimento de dimensionamento da amostra por estimação da média populacional com variância populacional desconhecida, utilizando-se a tabela T com nível de confiança de 95% e nível de significância de 5% com população finita.

Os critérios de inclusão para ambos os grupos foram:

- Faixa etária superior a 20 anos;
- Não apresentar doença pré-existente, incluindo *diabetes mellitus* tipo 1, cardiopatias graves (com repercussão hemodinâmica ou cianosantes), disfunção hepática (icterícia ou cirrose), falência renal (necessidade de diálise), HIV+, melanoma;
- Não ter feito uso de quimioterapia ou radiação nos seis meses prévios;
- Não apresentar doença psiquiátrica severa limitando a capacidade de compreensão e aceitação para participar com a doação do material;
- Aceitar em participar do estudo e assinar o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE);
- Não estar recebendo suplementação de vitaminas e/ou minerais.

O critério de inclusão específico para o grupo caso foi: indivíduos que tiveram CBC/CEC já submetidos a tratamento cirúrgico, atendidos na Clínica Dermatológica do Hospital; e para o grupo controle foi: pessoas que nunca tiveram CBC/CEC.

Os critérios de exclusão foram:

- Não aceitar participar da pesquisa/ou não responder aos questionários.

Os critérios de perda/descontinuação foram:

- Não realizar coleta do material biológico;
- Não conseguir mais contato com o sujeito no decorrer do estudo;
- Ser diagnosticado com alguma co-morbidade que está incluída no critério de inclusão durante o estudo;
- Para os grupos placebo e suplementados foi também a verificação de não adesão a intervenção durante a suplementação.

Para todos os grupos os dados demográficos coletados como fumo, etilismo, uso de protetor solar e exposição solar foi o relatado no momento da pesquisa (hábito atual), não foi realizado questionário para avaliação do uso/exposição destes parâmetros no passado do sujeito, o que é uma limitante do estudo. Para os antecedentes de câncer na família, o trabalho pesquisou os antecedentes para câncer geral, não dividindo o antecedente de câncer de pele não melanoma, o que também é um limitante do estudo.

Os indivíduos do grupo caso foram divididos em: grupo placebo (GP), recebendo suplementação de placebo e pelo grupo suplementado (GS) recebendo suplementação de antioxidantes (Vitaminas C, E e mineral Zinco).

A fim de satisfazer os propósitos do estudo, foram avaliados dados clínicos, hábitos de vida, dados antropométricos, sócio demográficos (Apêndice 1), de consumo alimentar (Anexo 1) antes de iniciar a suplementação de antioxidantes e foram avaliados os marcadores de estresse oxidativo em duas etapas, a saber: a) Tempo I, etapa realizada antes da suplementação de vitaminas C, E e mineral Zinco; b) Tempo II, etapa que foi executada, após o término da suplementação.

Para verificar e/ou garantir a adesão a intervenção (tomada de 3 comprimidos/cápsulas diferentes por dia) foi realizado acompanhamento dos

sujeitos do grupo placebo e suplementado, por telefone ou por visita domiciliar, não teve uma frequência exata de visitas e/ou telefonemas entre os pacientes e não foi usado nenhum método de verificação de adesão, o que é um limitante do estudo.

Vale destacar que nas duas etapas da pesquisa, os dados foram coletados de acordo com o mesmo protocolo e com instrumentos idênticos e previamente testados. Além disso, a aplicação de todos os questionários, a avaliação antropométrica e preparo do material biológico foram realizadas pela responsável pela pesquisa e orientandas de Iniciação Científica Voluntária.

## 4.2 Randomização

Os sujeitos que tiveram câncer de pele não melanoma foram distribuídos aleatoriamente, através de sorteio realizado por um sistema de randomização via Internet (<http://www.randomizer.org/>), em 2 grupos terapêuticos:

- Grupo Placebo (GP): Recebendo suplementação de placebo (cápsulas com igual apresentação do grupo estudo, preenchidas com lactose).
- Grupo Suplementado (GS): Recebendo suplementação de nutrientes antioxidantes: vitamina C e E baseados na *Tolerable Upper Intake Level - Dietary References Intakes* (UL-DRIs-2001) <sup>(55)</sup>, e de zinco, definida segundo as *Dietary References Intakes* (DRIs), preconizadas pelo Institute of Medicine e publicada pela *National Academy Press* em 2002<sup>(107)</sup>.

## 4.3 Suplementação

A suplementação dos nutrientes foi administrada simultaneamente 1 vez ao dia, logo após o jantar, por um período de 60 dias. Coletando-se dosagens



sanguíneas iniciais e finais respectivamente no primeiro dia antes da intervenção e após os 60 dias de intervenção (Quadro 2).

**Quadro 2.** Doses e marcas utilizadas dos suplementos de Zinco, Vitamina E e Vitamina C.

Nutrientes	Dose Suplementada	Marca
Zinco	40 mg	CVS Quality, USA
Vitamina C	500 mg	CVS Quality, USA
Vitamina E	400mg	Nature's Bounty, USA

#### 4.4 Coleta de Material Biológico

O sangue venoso foi coletado, estando os sujeitos em jejum de, no mínimo, 10 horas, sendo coletado com seringas plásticas descartáveis e agulhas de aço inoxidável, estéreis e descartáveis. Depois foi transferido para tubos Vacutainer® contendo ácido etileno diamino tetracético (EDTA) como anticoagulante, para obtenção do plasma e sem EDTA, para obtenção do soro. O plasma e o soro foram separados por centrifugação a 2500 rpm a 10 minutos a 4°C. O plasma e o soro obtidos foram armazenados em freezer -80°C até a realização das determinações. O volume de sangue coletado para a realização das análises foi de 5 mL.

#### 4.5 Separação dos Componentes do Sangue

Para determinação dos parâmetros bioquímicos pesquisados, o plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C (centrífuga SIGMA 2K15). O plasma foi extraído com pipeta automática e acondicionado em tubos “*ependorfs*” de polipropileno, sendo a seguir conservados a -80°C para análises posteriores. O volume de sangue, coletado com EDTA como anticoagulante, foi distribuído em 3 tubos “*ependorfs*” para determinação das concentrações séricas de isoprostano (1mL), nitrito (1mL) e

TBARS (1mL) e 1mL, de sangue, coletado com citrato como anticoagulante, destinado a determinação das concentrações séricas da Capacidade antioxidante total (CAOT).

## **4.6 Determinações dos Parâmetros Bioquímicos**

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Farmacotécnica e Farmácia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) as análises foram realizadas pelas alunas de iniciação científica e mestrado do grupo de pesquisa da Profa. Dra. Patricia Moriel.

### **4.6.1 Dosagem de nitrito pela reação de Griess**

A síntese de  $\text{NO}^*$  foi avaliada por meio da quantificação de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), metabólico estável do  $\text{NO}^*$ , pelo método de Griess <sup>(108)</sup>. A reação é colorimétrica e se baseia na reação dos nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico de coloração rósea.

Para o preparo da Solução de Griess, separou-se 60 ml de água destilada na proveta; pesou-se 0,5 g de ácido sulfanílico, pesou-se 0,002 g de N(1-Naftil) e separou-se 14 ml de ácido acético. Adicionaram-se todos os componentes ao béquer e misturou-se até dissolver. Colocou-se em frasco âmbar e rotulou-se.

Para determinação do nitrito nas amostras, primeiramente foi preparada uma curva padrão de 8 pontos (concentrações de 0,25 mmol/L a 20 mmol/L) com nitrito de sódio (Ecidra Cetus, Santo Amaro, Brasil)

O quadro 3 mostra o procedimento de determinação do nitrito tanto nas amostras como na curva padrão. Todas as análises foram realizadas em duplicata e a reação foi realizada em placa de ELISA Microplate 96 poços. As

concentrações de nitrito foram calculadas por extrapolação para uma curva padrão de NaNO<sub>2</sub> e os dados expressos em μmoles de nitrito <sup>(108)</sup>.

**Quadro 3.** Procedimento de determinação de nitrito nas amostras e na curva padrão.

	Plasma	Pontos da Curva Padrão	Água (Branco)
Amostra	30 uL	30 uL	30 uL
Solução de Griess	150 uL	150 uL	150 uL

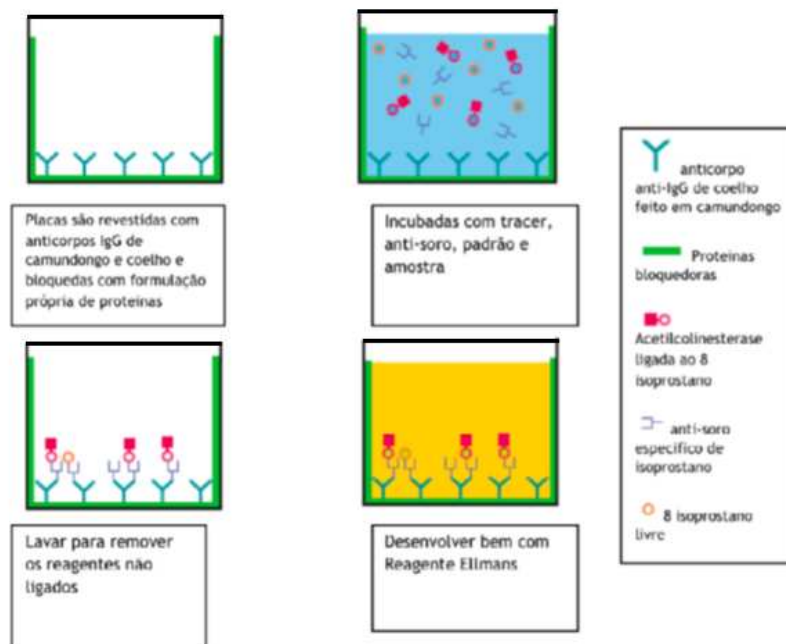
Repouso por 15 minutos  
Leitura em 545 nm (Biorad 2550 READER EIA. EUA)

#### 4.6.2 Determinação da capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total do Plasma coletado com citrato foi determinada usando o Kit comercial Antioxidante Assay Kit (Cayman, USA). Este Kit não separa os antioxidantes lipossolúveis dos hidrossolúveis, ele combina a atividade antioxidante de todos os constituintes incluindo vitaminas, proteínas, glutathione, ácido úrico, entre outros. O ensaio é baseado na capacidade dos antioxidantes da amostra inibir a oxidação de ABTS<sup>®</sup> (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolona-sulfonato]) para ABTS<sup>®+</sup> pela metamioglobina. A quantidade de ABTS<sup>®+</sup> produzido pode ser monitorada em absorvância 750 ou 405 nm. Os antioxidantes da amostra causam diminuição da absorvância da amostra que é proporcional à concentração. A capacidade de antioxidantes da amostra para evitar a oxidação de ABTS é comparada com a de Trolox, um análogo de tocoferol solúvel em água e é quantificada como mM de equivalentes de Trolox <sup>(93)</sup>. A capacidade antioxidante total do plasma demonstrada por estudos científicos varia de 0,5mmol/L a 2,0 mmol/L <sup>(93)</sup>.

### 4.6.3 Determinação de 8-Isoprostano livre

A concentração de isoprostano livre do plasma foi determinada utilizando-se um kit comercial Isoprostane Express EIA Kit (Cayman, USA). O kit é baseado em um imunoenensaio competitivo, onde 8-isoprostano da amostra compete com 8-isoprostano conjugado com acetilcolinesterase (8-isoprostane tracer) pelos sítios de um anticorpo específico de 8-isoprostanos feito em coelho. Uma vez que o 8-isoprostane tracer tem uma concentração constante e o 8-isoprostano da amostra não, a quantidade do 8-isoprostane tracer que se liga ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração da amostra. A figura 6 demonstra um esquema de como é o processo. No poço da placa tem-se ligado um anticorpo monoclonal anti IgG de coelho feito em camundongo. O anticorpo anti-isoprostano livre ou ligado ao isoprotano da amostra ou ao 8-isoprostane tracer se complexa com o anticorpo anti IgG de coelho, e o restante é lavado da placa. A reação é revelada adicionando o reagente de Ellman's (cujo substrato é a acetilcolinesterase) e o produto da reação enzimática é lido em 412 nm. A intensidade da cor revela a quantidade de 8-isoprostane tracer ligado no poço, que é inversamente proporcional à quantidade de 8-isoprostano na amostra. A concentração de 8-isoprostano obtida é relativa à quantidade de 8-isoprostano livre no plasma e não total.



**Figura 6.** Esquema de Desenvolvimento do Processo de Análise do Isoprostano.

Fonte: *Isoprostane Express EIA Kit (Cayman, USA).*

#### 4.6.4 Dosagem do TBARS (Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico)

A dosagem de TBARS consiste na detecção de aldeídos reativos ao ácido tiobarbitúrico. Adicionou-se em tubos de fundo cônico em duplicata 600 µL de água destilada + 400 µL de plasma + 1mL de solução de ácido tiocloroacético (TCA) marca Synth (Diadema-Brasil), a 17,5% + 1 mL de ácido tiobarbitúrico marca Sigma (Brasil) a 0,6% pH2. A solução foi homogeneizada por vortex e colocada em banho Maria por 1 hora para a reação acontecer entre os ácidos e a amostra. Os tubos foram furados para diminuir a pressão interna. Retirou-se do banho maria e centrifugou-se a 3000 rpm por 15 minutos. Após retirar os tubos da centrífuga, adicionou-se a placa de Elisa 200 µL. As análises foram feitas por espectrofotometria (534 nm). A concentração foi calculada usando o coeficiente de extinção molar ( $1,56 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}$ ) e os resultados expressos em nmol/ mL de plasma nmol de MDA por mL de plasma.

## 4.7 Avaliação Nutricional

Os sujeitos incorporados à pesquisa foram submetidos à avaliação nutricional, utilizando-se os parâmetros: peso, altura, prega cutânea tricipital (PCT), circunferência do braço (CB), circunferência muscular do braço (CMB).

O peso corporal foi aferido em balança eletrônica digital portátil marca Plena (Brasil), com capacidade de 150 kg e sensibilidade de 100g, instalada em local afastado da parede, com superfícies planas, firmes e lisas. A estatura foi medida com um antropômetro marca Seca®, graduado em centímetros e com barra de madeira vertical e fixa, para posicionamento sobre a cabeça do indivíduo, estando os participantes descalços, como os pés unidos, em posição ereta, olhando para frente. O peso e a estatura foram medidos três vezes para cada participante, sendo então obtida a média dessas medidas. O peso foi medido em quilogramas e a estatura em centímetros <sup>(109,110)</sup>.

A PCT foi determinada com o auxílio de fita graduada, localizada no ponto médio entre o acrômio e o olecrano com o braço flexionado junto ao corpo, formando um ângulo de 90°. A prega foi mensurada na parte posterior do braço, com os braços relaxados e estendidos ao longo do corpo. Foram realizadas três medidas e calculada a média. Os resultados foram expressos em milímetros e comparados com os padrões propostos por Jellife <sup>(111)</sup>.

A CB foi aferida por meio de uma fita métrica, obtida na metade da distância do braço não dominante, entre o acrômio e olecrano com o indivíduo em pé. Durante a determinação do ponto médio, o braço permaneceu flexionado; já durante a determinação da circunferência do braço, este permaneceu estendido e relaxado ao longo do corpo. Três medidas sucessivas foram obtidas e calculadas a média, sendo esta, o valor considerado. Os resultados foram expressos em centímetros e comparados com os padrões propostos por Jellife <sup>(111)</sup>.

A circunferência muscular do braço (CMB) foi calculada a partir do valor obtido da CB e da PCT, pela fórmula:

$$\text{CMB (cm)} = \text{CB (cm)} - (0,314 \times \text{PCT})$$

Para interpretação dos resultados foi utilizada a faixa de normalidade simplificada de acordo com Jelliffe <sup>(111)</sup>, cujos valores para sexo masculino são 25,3 cm, 29,3 cm e 12,5 mm para CMB, CB, PCT respectivamente, e para o sexo feminino são 23,2 cm, 28,5 cm, 16,5 mm para CMB, CB e PCT respectivamente.

Todas as medidas antropométricas foram aferidas por um único observador, obedecendo ao prescrito no *International Standards for Anthropometric Assessment* e as recomendações do Manual de Técnicas e Procedimentos do Ministério da Saúde (2003) <sup>(109,110)</sup>.

Para a classificação do EN em relação ao percentual de CB, PCT e CMB, foram utilizados os valores de Blackburn e Bistran <sup>(112)</sup> que estão expressos na tabela 1.

**Tabela 1.** Estado nutricional segundo % circunferência do braço (CB), % prega cutânea tricipital (PCT) e % circunferência muscular do braço (CMB).

Valores (% CB, PCT e CMB)	Classificação
< 60	Desnutrição severa
60 a 80	Desnutrição moderada
80 a 90	Desnutrição leve
90 a 110	Eutrofia
110 a 120	Obesidade leve
120 a 130	Obesidade moderada
130 a 200	Obesidade severa
≥ 200	Obesidade mórbida

Fonte: Blackburn e Bistran <sup>(112)</sup>.

Para idosos, os valores de PCT, CB e CMB foram comparados ao percentil 50 de acordo com sexo e idade preconizados *National Health and Nutrition Examination Survey - NHANES III* <sup>(113)</sup>.

Para a classificação do estado nutricional segundo o índice de massa corporal (IMC), para a faixa etária inferior a 60 anos, foram adotados os padrões de referência estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde <sup>(114)</sup> na tabela 2.

**Tabela 2.** Parâmetros para avaliação do estado nutricional pelo Índice de massa corporal (IMC) para a faixa etária inferior a 60 anos.

Classificação	IMC (kg/m <sup>2</sup> )
Baixo peso	< 18,50
Eutrófico	18,50 a 24,9
Excesso de peso	≥ 25,00
Pré obeso	25,00 – 29,99
Obeso	≥ 30,00
Obeso 1	30,00 – 34,99
Obeso 2	35,00 – 39,99
Obeso 3	≥ 40,00

Fonte: WHO <sup>(114)</sup>.

Para a classificação do estado nutricional segundo o índice de massa corporal (IMC), para a faixa etária superior a 60 anos, foram adotados os padrões de referência estabelecidos pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) <sup>(115)</sup>: baixo peso ( $IMC \leq 23 \text{ kg/m}^2$ ), peso normal ( $23 < IMC < 28 \text{ kg/m}^2$ ), pré-obesidade ( $28 \leq IMC < 30 \text{ kg/m}^2$ ) e obesidade ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ).

#### 4.8 Avaliação do Consumo Alimentar Habitual

Os sujeitos da pesquisa foram solicitados a preencher um QFA (Questionário de Frequência Alimentar) validado por Crispim *et al.* <sup>(116)</sup>. Foram fornecidas, no momento da entrega dos formulários, orientações quanto à forma correta de anotar os alimentos, de discriminar porções de alimentos, medidas caseiras, quantidades em que as mesmas foram consumidas. Nesse questionário, os alimentos foram ordenados em nove grupos alimentares: carnes e pescados,



leite e derivados, cereais e farinhas, leguminosas, hortaliças grupos A, B, C, Frutas Grupos A, B, doces, bebidas e infusões, diversos. As categorias de frequência de consumo incluíram: todos os dias, 3 dias/semana, 3 dias/mês, quinzenalmente, nunca come determinado alimento. Os participantes indicaram a frequência do consumo dos alimentos em um período de tempo determinado e a porção consumida.

Esses alimentos foram devidamente quantificados em medidas caseiras, transformadas em gramas, com o auxílio de um guia de medidas caseiras <sup>(117)</sup> e teve sua composição nutricional, referente ao teor de antioxidantes (zinco, selênio, cobre, vitamina C, vitamina E e vitamina A) avaliada por meio do software NutWim 2.5 do Departamento de Informática em Saúde da Universidade Federal de São Paulo <sup>(118)</sup>. Os alimentos não encontrados no programa foram incluídos tomando-se por base a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos <sup>(119)</sup>.

Os dados obtidos do QFA foram utilizados para determinar o consumo alimentar habitual da seguinte forma: primeiramente, as frequências de consumo foram transformadas em frequências diárias. Desta forma, três vezes por mês foi transformada em 0,1 ( $3 \div 30 = 0,1$ ) e, assim sucessivamente. Foi utilizada a média do intervalo de frequência de forma que duas a quatro vezes por semana foi transformada em  $3/7$  ( $3 \div 7$ ), conforme realizado por Sichieri e Everhardt <sup>(120)</sup> no estudo de validação. Em seguida, as frequências diárias foram multiplicadas pelas quantidades em gramas ou mililitros dos alimentos.

Os valores de ingestão de micronutrientes foram ajustados pela energia, utilizando-se o método do nutriente residual <sup>(121)</sup>. Esse ajuste é necessário, a fim de evitar distorções nos valores de ingestão dos micronutrientes analisados, resultantes de variações no consumo de energia.

O cálculo consiste em 4 equações, como segue:

Inicialmente, realizou-se análise de regressão linear simples, considerando-se o total de energia ingerida como variável independente e o valor absoluto do

nutriente como variável dependente. Utilizando-se a equação geral da regressão linear, pôde-se determinar a quantidade estimada de nutriente ( $Y_e$ ) que o indivíduo deveria consumir com a sua média de consumo de energia.

$$\text{Equação 1: } Y_e = \beta_0 + \beta_1 \times \text{média do consumo energético do indivíduo}$$

O resíduo da regressão ( $Y_r$ ) representa a diferença entre a ingestão atual observada ( $Y_o$ ) para cada indivíduo e a ingestão estimada.

$$\text{Equação 2: } Y_r = Y_o - Y_e$$

Por definição, o resíduo possui média zero e pode apresentar valores positivos e negativos. Com isso, faz-se necessária a adição de uma constante, que é estatisticamente arbitrária. Willett *et al.* <sup>(122)</sup> propõem que a constante seja o consumo do nutriente estimado para a média do total de energia consumida pela população de estudo.

$$\text{Equação 3: } Y_c = \beta_0 + \beta_1 \times \text{média do consumo energético da população}$$

O valor do nutriente ajustado ou residual ( $Y_a$ ) consiste na soma do  $Y_r$  e da constante  $Y_c$  e refere-se ao valor do nutriente ingerido não correlacionado com o total de energia consumida.

$$\text{Equação 4: } Y_a = Y_r + Y_c$$

Para verificar a adequação dos nutrientes antioxidantes, reportou-se ao preconizado nas Dietary Reference Intakes – DRI's (Ingestões dietéticas de referência), Necessidade Média Estimada (EAR) como parâmetros de comparação <sup>(55,107)</sup>. Os pontos de corte utilizados como referência diária de nutrientes estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Valores Referentes à DRI/ EAR (necessidade média estimada) para os Nutrientes Antioxidantes.

<b>Nutriente</b>	<b>Sexo</b>	<b>EAR</b>
Selênio (Se)	Masculino	45 µg/d
	Feminino	45 µg/d
Zinco (Zn)	Masculino	9,4mg/d
	Feminino	6,8 mg/d
Cobre (Cu)	Masculino	700 µg/d
	Feminino	700 µg/d
Vitamina A	Masculino	625 µg/d
	Feminino	500 µg/d
Vitamina C	Masculino	75 mg/d
	Feminino	60 mg/d
Vitamina E	Masculino	12 mg/d
	Feminino	12 mg/d

Fonte: DRI's (55, 107).

#### **4.9 Instrumento de Coleta de Dados**

Para obtenção dos dados sócio demográficos, clínicos e dos hábitos de vida, foi aplicado, por meio de entrevista, um questionário elaborado pela pesquisadora responsável, devidamente testado, o qual continha informações de identificação, dados antropométricos, hábitos de vida, uso de medicamentos (Apêndice 1).

#### **4.10 Análise Estatística**

Para a análise estatística foi utilizado o programa computacional *SAS System for Windows* (SAS® 9.3, SAS Institute Inc, Cary, NC, EUA) <sup>(123)</sup> e o *Statistics Program for Social Science for Windows* (SPSS® 16.0, SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Foi realizada análise exploratória de dados, através de medidas resumo (frequência) dos dados categóricos e estatísticas descritivas dos dados quantitativos. Foram utilizados o teste Qui-quadrado e o Teste Exato de

Fisher para comparação das variáveis categóricas e o teste de Mann-Whitney para a comparação das variáveis numéricas (caso/controle e placebo/suplementado); foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas (*ANOVA for repeated measures*) para a comparação dos valores numéricos entre os grupos de caso/controle e placebo/suplementado e entre os tempos. As variáveis foram transformadas em postos (*ranks*) devido à ausência de distribuição normal. Para identificação dos fatores associados ao câncer de pele foi utilizada a análise de Regressão Logística Univariada e Multivariada. Ainda, a Correlação de Spearman foi utilizada para correlacionar parâmetros de concentrações dietéticas de nutrientes antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo. O nível de significância adotado para este estudo foi de 5% <sup>(124)</sup>.

#### **4.11 Aspectos Éticos**

Para realizar a coleta de dados solicitou-se consentimento do Hospital local de pesquisa. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí sob número do Certificado de apresentação para apreciação ética (CAAE) 0055.0045.000-10 (Anexo 2). Os sujeitos foram esclarecidos sobre o estudo, os objetivos e os procedimentos, e foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2) em duas vias, sendo uma para o participante e a outra para o pesquisador, conforme previsto pela Resolução Nº. 196 / 96, do Conselho Nacional de Saúde <sup>(125)</sup>, assegurando que os participantes terão sua identidade preservada no anonimato.

## **5. RESULTADOS**





## 5.1 Fase 1

Um total de 24 controles e 60 casos foram incluídos no trabalho. As características sociodemográficas e hábitos de vida dos grupos controle e caso estão demonstrados na tabela 4. A média de idade para o grupo controle foi de  $56,7 \pm 11,6$  anos, enquanto para o grupo caso foi  $62,7 \pm 14,2$  anos ( $p=0,0492$ , Teste de Mann-Whitney). Em relação ao tempo médio diário de exposição ao sol, o grupo controle apresentou em média  $35,0 \pm 28,9$  minutos de exposição e o grupo caso  $180,5 \pm 123,8$  minutos ( $p<0,0001$ , Teste de Mann-Whitney).

Nos grupos casos, a localização mais frequente dos tumores foi na face, em 81,2% dos casos, e 85% dos sujeitos foram diagnosticados com carcinoma basocelular.

Quanto à ocupação atual, 66,7% dos controles eram empregados terceirizados que exerciam função de servente de limpeza, 33,3% eram aposentados. No grupo caso 29,1% eram aposentados, 29,1% eram domésticas, 33,3%, funcionários públicos e 8,3%, profissional liberal, reiterando-se que na infância, adolescência e na fase adulta expunham-se livremente ao sol, exercendo atividades de: lavradores e pescadores.

**Tabela 4.** Características sócio demográficas e hábitos de vida dos grupos caso e controle.

	<b>Controle</b>	<b>Caso</b>	<b>Valor de p</b>
	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	
<b>Número total</b>	24	60	
<b>Sexo</b>			
Masculino	5 (20,8%)	21 (35,0%)	0,2045
Feminino	19 (79,2%)	39 (65,0%)	
<b>Hábito de Fumar</b>			
Sim	3 (13%)	8 (13,3%)	0,6645
Não	21 (87%)	52 (86,7%)	
<b>Uso de Protetor Solar</b>			
Sim	6 (25,0%)	41 (68,3%)	<b>0,0003*</b>
Não	18 (75,0%)	19 (31,7%)	
<b>Tempo de Exposição ao Sol (diário)</b>			
≤ 60 minutos	22 (91,7%)	16 (26,7%)	<b>&lt;0,0001*</b>
> 60 minutos	2 (8,3%)	44 (73,3%)	
<b>Uso de Bebidas Alcoólicas</b>			
Sim	3 (12,5%)	9 (15,0%)	0,7307
Não	21 (87,5%)	51 (85,0%)	
<b>Antecedentes para o Câncer</b>			
Sim	4 (16,7%)	42 (70,0%)	<b>&lt;0,0001*</b>
Não	20 (83,3%)	18 (30,0%)	
<b>Cor de Pele</b>			
Branca	8 (33%)	11 (18,3%)	0,1377
Parda	16 (67%)	49 (81,7%)	

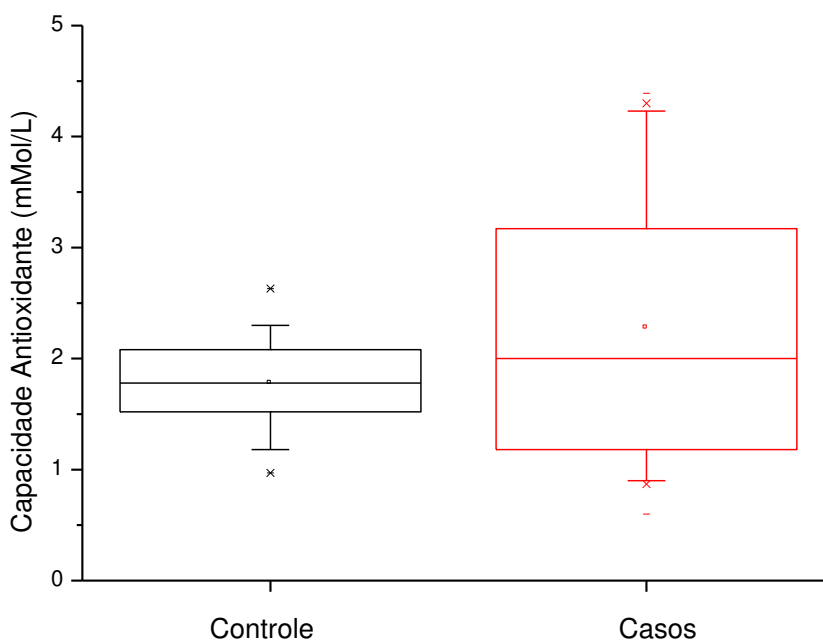
Legenda: N= número total. Teste Qui-Quadrado, \*Teste Exato de Fisher,  $p < 0,05$  – diferença estatística significativa.

Com relação às variáveis analisadas idade, uso de bloqueador solar, tempo de exposição ao sol e antecedentes familiares de câncer apresentaram associação estatística significativa. Portanto, para serem realizadas as comparações estatísticas dos parâmetros estudados entre os grupos, os resultados foram ajustados por essas variáveis.



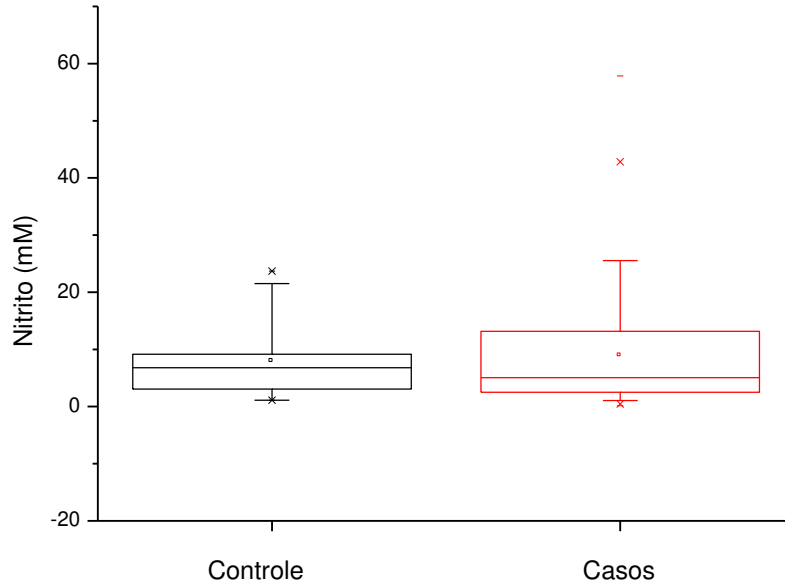
### 5.1.1 Avaliação do Estresse Oxidativo

A Figura 7 demonstra a comparação das concentrações plasmáticas de capacidade antioxidante total do grupo controle ( $1,8 \pm 0,4$  mMol/L) e casos ( $2,3 \pm 1,1$  mMol/L).



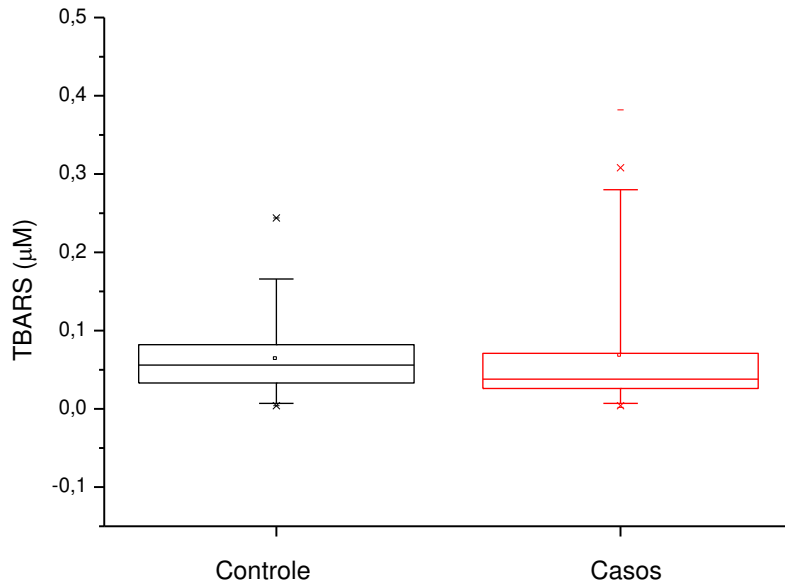
**Figura 7.** Capacidade Antioxidante Total dos grupos controle (n = 24) e grupo caso (n = 60). Legenda: Teste ANOVA para medidas repetidas. Não existiu diferença estatística significativa ( $p = 0,8767$ ).

A Figura 8 demonstra a comparação da concentração plasmática de nitrito do grupo controle ( $7,9 \pm 6,5$  mM) e casos ( $8,9 \pm 10,6$  mM).



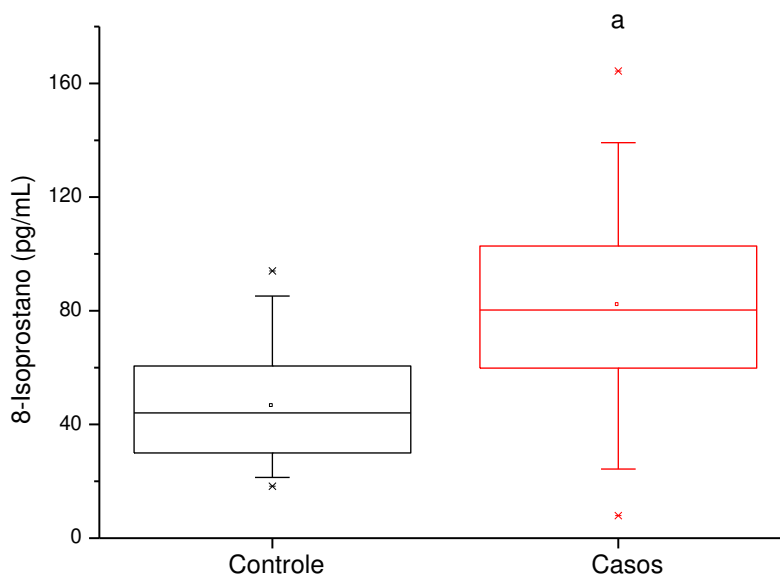
**Figura 8.** Concentração plasmática de Nitrito do grupo controle (n= 24) e grupo caso (n = 60). Legenda: Teste ANOVA para medidas repetidas, Não existiu diferença estatística significativa (p= 0,2676).

A Figura 9 demonstra a comparação da concentração plasmática de TBARS do grupo controle ( $0,06 \pm 0,05 \mu\text{M}$ ) e casos ( $0,07 \pm 0,08 \mu\text{M}$ ).



**Figura 9.** Concentração plasmática das Espécies Reativas de Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) do grupo controle (n = 24) e grupo caso (n = 60). Legenda: Teste ANOVA para medidas repetidas. Não existiu diferença estatística significativa (p = 0,1880).

A Figura 10 demonstra a comparação da concentração plasmática de F2-isoprostano do grupo controle ( $46,3 \pm 21,8$  pg/mL) e casos ( $81,9 \pm 36,4$  pg/mL). Existiu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) para o grupo caso em relação ao grupo controle.



**Figura 10.** Concentração plasmática de F2-isoprotanos do grupo controle ( $n = 24$ ) e grupo caso ( $n = 60$ ). Legenda: Teste ANOVA para medidas repetidas. A = diferença estatística significativa ( $p < 0,0001$ ).

As concentrações plasmáticas dos marcadores de estresse oxidativo mostraram-se elevadas no grupo caso em relação aos indivíduos controles; somente diferente estatisticamente para o F2-isoprostanos, sinalizando-se para um estado pró-oxidante dos casos. Observando as figuras apresentadas, nota-se que as médias e medianas para as concentrações plasmáticas de nitrito, TBARS e F2-isoprostanos estão próximas e que a distribuição dos indivíduos foi simétrica. Já para Capacidade Antioxidante Total somente o grupo controle foi simétrico, o grupo casos apresentou uma variação grande intragrupo e foi assimétrica.

### 5.1.2 Avaliação do Estado Nutricional e do consumo alimentar

Os resultados dos parâmetros antropométricos estão na tabela 5. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os parâmetros antropométricos entre os grupos caso e controle.

**Tabela 5.** Parâmetros antropométricos segundo os grupos controle e caso.

Variáveis	Controle (n = 24)	Caso (n = 60)	Valor de p
<b>Peso (kg)</b>	66,4 ± 13,1	63,9 ± 10,1	0,6300
<b>Altura (m)</b>	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,9	0,4750
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	27,3 ± 3,5	26,3 ± 3,7	0,2710
<b>PCT (mm)</b>	20,2 ± 6,8	18,4 ± 7,8	0,1750
<b>CB (cm)</b>	30,9 ± 3,1	30,0 ± 4,5	0,1910
<b>CMB (cm)</b>	24,6 ± 3,0	24,5 ± 4,0	0,7100

Legenda: IMC - Índice de Massa Corporal; PCT- Prega Cutânea Tricipital; CB- Circunferência Branquial; CMB - Circunferência Muscular do Braço. Teste de Mann-Whitney,  $p > 0,05$  Diferença não significativa.

A classificação do estado nutricional realizada por meio de parâmetros antropométricos como: o índice de massa corporal (IMC), % prega cutânea e % das circunferências estão na Tabela 6.

**Tabela 6.** Avaliação do estado nutricional a partir do índice de massa corporal (IMC), Prega cutânea tricipital (PCT), Circunferência do braço (CB), Circunferência muscular do braço (CMB) dos grupos controle e caso.

Índices Antropométricos	Classificação	Controle (n = 24)		Caso (n = 60)		p
		N	%	N	%	
IMC	Eutrofia	6	25,0	31	51,6	<b>0,0002*</b>
	Obesidade	5	20,8	16	26,7	
	Sobrepeso	13	54,2	13	21,7	
PCT	Eutrofia	3	12,5	11	18,3	0,401
	Excesso de massa adiposa	16	66,7	34	56,7	
	Déficit de massa adiposa	5	20,8	15	25,0	
CB	Eutrofia	11	45,8	23	38,3	0,389
	Excesso de massa magra/adiposa	12	50,0	24	40,0	
	Déficit de massa magra/adiposa	1	4,2	13	21,7	
CMB	Eutrofia	7	29,2	20	33,3	<b>0,0180*</b>
	Excesso de massa magra	4	16,7	21	35,0	
	Déficit de massa magra	13	54,2	19	31,7	

N = número de sujeitos. Teste Qui-quadrado, \*Teste Exato de Fisher,  $p < 0,05$  - diferença significativa.

O diagnóstico nutricional pelo IMC mostrou predominância de sobrepeso no grupo controle e de eutrofia no grupo caso com diferença significativa. Em relação ao índice CMB, houve prevalência de déficit de massa magra no grupo controle e excesso de massa magra no grupo caso com diferença estatística. Já os índices PCT e CB não diferiram estatisticamente entre os grupos.

### ***Avaliação do Consumo Alimentar Habitual dos sujeitos***

Nessa etapa do trabalho reporta-se a análise da frequência de consumo alimentar dos sujeitos, com o intuito de caracterizar o panorama geral das condições alimentares.

Os alimentos referendados com consumo semanal (até 1 vez ou 2-6 vezes/semana) estão expostos na Tabela 7 distribuídos entre os grupos controle e caso.

**Tabela 7.** Frequência de consumo alimentar semanal por alimento dos grupos controle e caso.

Alimentos	Controle (n=24)		Caso (n=60)		Valor de p
	N	%	N	%	
<b>Leite</b> <sup>(1)</sup>					
0 a 1 vez/semana	10	41,7	26	43,3	<b>0,0012<sup>(1)</sup></b>
2 a 6 vezes/semana	14	58,3	04	6,7	
<b>Ovo cozido</b>					
0 a 1 vez/semana	17	70,8	53	88,3	<b>0,1010*</b>
2 a 6 vezes/semana	7	29,2	07	11,7	
<b>Carne bovina</b>					
0 a 1 vez/semana	11	45,8	43	71,7	0,0256*
2 a 6 vezes/semana	13	54,2	17	28,3	
<b>Carne de frango</b>					
0 a 1 vez/semana	04	16,7	23	38,3	0,0548
2 a 6 vezes/semana	20	83,3	37	61,7	
<b>Peixe</b>					
0 a 1 vez/semana	10	41,7	40	66,7	<b>0,0350*</b>
2 a 6 vezes/semana	14	58,3	20	33,3	
<b>Biscoito</b>					
0 a 1 vez/semana	16	66,7	30	50,0	0,1656
2 a 6 vezes/semana	8	33,3	30	50,0	
<b>Pão francês</b>					
0 a 1 vez/semana	01	4,2	21	35,0	<b>0,0037*</b>
2 a 6 vezes/semana	23	95,8	39	65,0	
<b>Bolo</b>					
0 a 1 vez/semana	09	37,5	41	68,3	<b>0,0092*</b>
2 a 6 vezes/semana	15	62,5	19	31,7	
<b>Macarrão</b>					
0 a 1 vez/semana	11	45,8	44	73,3	<b>0,0166*</b>
2 a 6 vezes/semana	13	54,2	16	26,7	
<b>Laranja</b>					
0 a 1 vez/semana	12	50,0	30	50,0	1,0000
2 a 6 vezes/semana	12	50,0	30	50,0	
<b>Mamão</b>					
0 a 1 vez/semana	12	50,0	36	60,0	0,4028
2 a 6 vezes/semana	12	50,0	24	40,0	
<b>Abóbora</b>					
0 a 1 vez/semana	08	33,3	18	30,0	0,7653
2 a 6 vezes/semana	16	66,7	42	70,0	
<b>Feijão</b>					
0 a 1 vez/semana	05	20,8	11	18,3	0,7670
2 a 6 vezes/semana	19	79,2	49	81,7	
<b>Tomate</b>					
0 a 1 vez/semana	12	50,0	12	20,0	<b>0,0060*</b>
2 a 6 vezes/semana	12	50,0	48	80,0	

Legenda: <sup>(1)</sup> 50% dos casos referiram consumo diário de leite. Qui-Quadrado, \*Teste Exato de Fisher, p<0,05 = diferença significativa

Legenda: Qui-Quadrado, \*Teste Exato de Fisher, p<0,05 = diferença significativa.

Os resultados da análise da frequência de consumo habitual mostraram um consumo estatisticamente inferior no grupo caso dos alimentos: carne bovina, peixes, pão francês, bolo e macarrão; e estatisticamente superior de tomate no grupo caso; ambos os grupos apresentaram consumo insuficiente de laranja, mamão, abóbora e feijão, sem diferença estatística.

### ***Análise e adequação da dieta quanto aos nutrientes antioxidantes***

As concentrações dietéticas dos nutrientes antioxidantes ajustadas pela energia nos grupos caso e controle estão expostas na tabela 8.

**Tabela 8.** Concentrações dietéticas médias e desvios padrão do consumo de nutrientes antioxidantes na dieta habitual do grupo controle e grupo caso.

<b>Parâmetros</b>	<b>Controle (n=24) Média ± DP</b>	<b>Caso (n=60) Média ± DP</b>	<b>EAR<sup>#</sup></b>	<b>P</b>
<b>Vitamina A (µg)</b>	380,9 ± 197,1	558,0 ± 570,0	625	<b>0,0010</b>
<b>Vitamina C (mg)</b>	162,4 ± 19,3	57,9 ± 50,6	75	0,2220
<b>Vitamina E (mg)</b>	6,1 ± 14,2	9,6 ± 7,02	12	<b>0,0010</b>
<b>Cobre (µg)</b>	1040,0 ± 1009,0	800,0 ± 400,0	700	<b>0,0330</b>
<b>Zinco (mg)</b>	10,1 ± 12,6	6,5 ± 3,6	9,4	<b>0,0310</b>
<b>Selênio (µg)</b>	52,2 ± 44,5	76,2 ± 38,8	45	<b>0,0280</b>

Legenda: DP= Desvio Padrão; EAR Estimativa de requerimento médio diferente para sexos (Vitamina A 625 µg/d masculino e 500 µg/d feminino. Zinco 9,4mg/d sexo masculino 6,8mg/d sexo feminino. Vitamina C 75mg masculino e 60mg/d feminino). Teste de Mann-Whitney diferença significativa (p<0,05).  
Concentrações dietéticas dos nutrientes ajustados pela energia.

No grupo controle, as concentrações dietéticas médias de vitamina C e dos minerais cobre, zinco e selênio ultrapassaram a EAR; e no grupo caso, apenas a ingestão média de selênio e cobre superaram a EAR, as concentrações dietéticas médias de vitamina A, C e E estavam inferiores aos valores da EAR, não alcançando, portanto, a cobertura nutricional preconizada. Houve diferença

estatística significativa quanto as concentrações dietéticas dos nutrientes Vitamina A, E, e dos minerais cobre, zinco e selênio entre os grupos caso e controle.

### 5.1.3 Correlações

A associação entre os marcadores de estresse oxidativo e as concentrações dietéticas de nutrientes antioxidantes no grupo controle mostrou correlação positiva, moderada ( $r=0,508$ ) e significativa ( $p=0,011$ ) entre CAOT e Vitamina A, e uma correlação negativa, fraca ( $r=-0,449$ ) e significativa ( $p=0,028$ ) entre nitrito e vitamina E (tabela 9).

**Tabela 9.** Análise da correlação linear simples entre os parâmetros de estresse oxidativo e concentrações dietéticas de nutrientes antioxidantes do grupo controle.

Marcadores de Estresse Oxidativo	Concentrações dietéticas de nutrientes antioxidantes					
	Vit A	Vit C	Vit E	Selênio	Cobre	Zinco
<b>Isoprostano</b>	$r=0,160$	$r=0,151$	$r=0,019$	$r=0,22$	$r=-0,201$	$r=-0,147$
	$p=0,466$	$p=0,491$	$p=0,932$	$p=0,117$	$p=0,359$	$p=0,503$
<b>TBARS</b>	$r=0,290$	$r=-0,077$	$r=-0,282$	$r=0,027$	$r=0,365$	$r=0,169$
	$p=0,163$	$p=0,722$	$p=0,182$	$p=0,793$	$p=0,079$	$p=0,431$
<b>CAOT</b>	$r=0,508$	$r=0,267$	$r=-0,206$	$r=0,146$	$r=0,206$	$r=-0,160$
	<b><math>p=0,011</math></b>	$p=0,226$	$p=0,334$	$p=0,15$	$p=0,334$	$p=0,455$
<b>Nitrito</b>	$r=-0,161$	$r=-0,321$	<b><math>r=-0,449</math></b>	$r=0,015$	$r=-0,311$	$r=-0,189$
	$p=0,453$	$p=0,126$	<b><math>p=0,028</math></b>	$p=0,882$	$p=0,139$	$p=0,376$

Legenda: CAOT= Capacidade antioxidante total; TBARS= Espécies reativas de ácido tiobarbitúrico. Vitamina A; Vitamina C; Vitamina E. Correlação de Spearman.

A associação entre os marcadores de estresse oxidativo e as concentrações dietéticas de nutrientes antioxidantes dos sujeitos que integravam o grupo caso mostrou correlação negativa, fraca ( $r=-0,324$ ) e significativa ( $p=0,021$ ) entre TBARS e Vitamina A (tabela 10).



**Tabela 10.** Análise da correlação linear simples entre os parâmetros de estresse oxidativo e as concentrações dietéticas de nutrientes antioxidantes do grupo caso.

Marcadores de Estresse Oxidativo	Concentrações dietéticas de nutrientes antioxidantes					
	Vit A	Vit C	Vit E	Selênio	Cobre	Zinco
Isoprostano	r=0,128	r=0,182	r=0,282	r=-0,009	r=0,056	r=0,023
	p=0,443	p=0,248	p=0,071	p=0,955	p=0,725	p=0,867
TBARS	<b>r=-0,324</b>	r=0,176	r=0,108	r=0,144	r=-0,034	r=0,197
	<b>p=0,021</b>	p=0,182	p=0,418	p=0,277	p=0,800	p=0,135
CAOT	r=-0,064	r=-0,002	r=-0,192	r=-0,046	r=-0,110	r=-0,040
	p=0,654	p=0,988	p=0,145	p=0,732	p=0,406	p=0,765
Nitrito	r=0,250	r=-0,057	r=0,175	r=0,127	r=0,022	r=0,112
	p=0,077	p=0,666	p=0,186	p=0,336	p=0,870	p=0,397

Legenda: CAOT= Capacidade antioxidante total; TBARS Espécies reativas de ácido tiobarbitúrico; Vitamina A; Vitamina C; Vitamina E. Correlação de Spearman.

#### 5.1.4 Medida de Associação

As variáveis *antecedentes para o câncer, capacidade antioxidante total e isoprostano*, através da regressão logística simples, foram associadas como fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de pele. A análise do modelo de regressão logística multivariada, ajustada para o *tempo de exposição diária ao sol*, identificou que as variáveis associadas ao câncer de pele são a *idade* e o marcador de estresse oxidativo *isoprostano*. Para cada ano a mais, eleva-se o risco da manifestação do câncer de pele em 12%, enquanto que, para cada unidade (pg/mL) a mais do biomarcador isoprostano, aumenta-se em 4% a chance do desenvolvimento desta patologia (Tabela 11).

**Tabela 11.** Análise de regressão logística para os fatores associados ao risco do desenvolvimento de câncer de pele não-melanoma.

Variáveis	N	OR	IC 95%	P
<b>Análise de Regressão Logística Simples</b>				
Antecedentes para o Câncer	84	11,657	3,489 - 39,014	<b>&lt;0,0001</b>
Tabagismo	84	1,077	0,260 - 4,457	0,9185
Cor de Pele	84	2,228	0,763 - 6,504	0,1428
Alcoolismo	84	1,235	0,304 - 5,019	0,7677
Idade	84	1,034	0,997 - 1,073	0,0734
<b>Biomarcadores Oxidativos</b>				
CAOT	84	1,772	1,013 - 3,100	<b>0,0449</b>
Isoprostano	84	1,039	1,017 - 1,061	<b>0,0005</b>
TBARS	84	2,351	0,003 - > 999	0,806
Nitrito	84	1,012	0,959 - 1,068	0,666

**Análise de Regressão Logística Multivariada**

Ajustada para o tempo de exposição ao sol

**Variável**

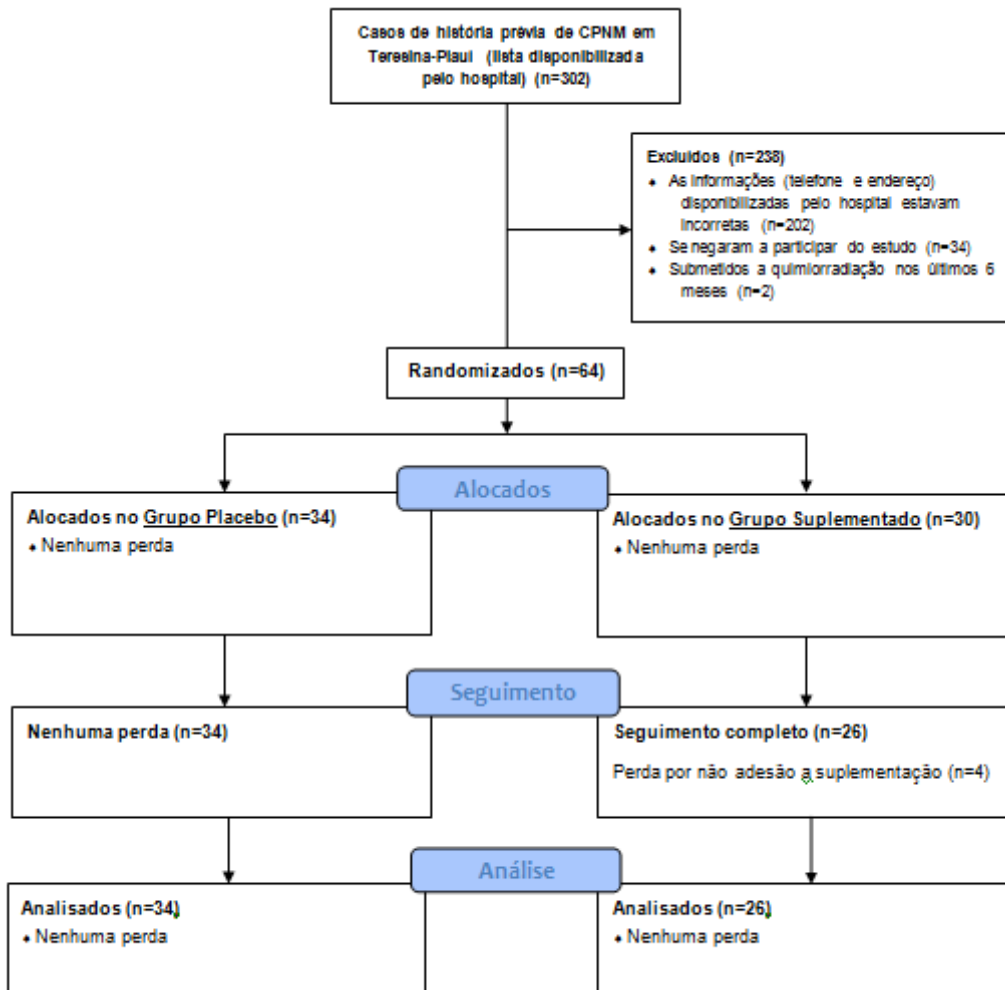
Idade	84	1,121	1,035 - 1,213	<b>0,005</b>
Isoprostano	84	1,044	1,010 - 1,078	<b>0,0099</b>

Legenda: N= número total; OD=odds ratio; IC=intervalo de confiança; CAOT=capacidade antioxidante total; TBARS= Espécies Reativas de Ácido Tiobarbitúrico.

**5.2 Fase 2**

A figura 11 demonstra o organograma de caracterização do estudo e a tabela 12 demonstra as características sociodemográficas e hábitos de vida dos grupos placebo e suplementado. A média de idade para o grupo placebo foi de  $65,6 \pm 13,2$  anos, enquanto para o grupo suplementado foi  $59,0 \pm 14,9$  anos

( $p=0,0860$ , Teste de Mann-Whitney). Em relação ao tempo médio diário de exposição ao sol, o grupo placebo apresentou em média  $199,4 \pm 130,2$  minutos de exposição e o grupo caso  $155,8 \pm 112,5$  minutos ( $p=0,2450$ , Teste de Mann-Whitney).



**Figura 11.** Organograma de caracterização do estudo (Fase 2).

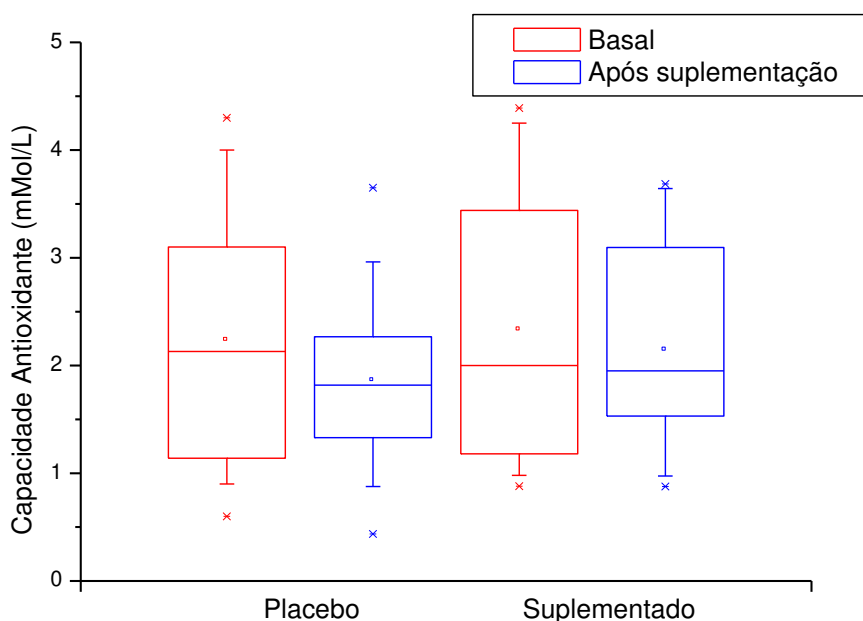
**Tabela 12.** Características sócio demográficas e hábitos de vida dos grupos placebo e suplementado.

	Placebo n (%)	Suplementado n (%)	Valor de p
<b>Número total</b>	34	26	
<b>Sexo</b>			
Masculino	10 (29,4%)	11 (42,3%)	0,2994
Feminino	24 (70,6%)	15 (57,7%)	
<b>Hábito de Fumar</b>			
Sim	4 (11,8%)	4 (15,4%)	0,7172
Não	30 (88,2%)	22 (84,6%)	
<b>Uso de Protetor Solar</b>			
Sim	22 (64,7%)	19 (73,1%)	0,4897
Não	12 (35,3%)	7 (29,9%)	
<b>Tempo de Exposição ao Sol (diário)</b>			
≤ 60 minutos	6 (17,6%)	10 (38,5%)	0,0798
> 60 minutos	28 (82,4%)	16 (61,5%)	
<b>Uso de Bebidas Alcoólicas</b>			
Sim	2 (5,9%)	7 (26,9%)	<b>0,0323*</b>
Não	32 (94,1%)	19 (73,1%)	
<b>Antecedentes para o Câncer</b>			
Sim	24 (70,6%)	18 (69,2%)	0,9095
Não	10 (29,4%)	8 (30,8%)	
<b>Cor de Pele</b>			
Branca	5 (14,7%)	6 (23,1%)	0,5072*
Parda	29 (85,3%)	20 (76,9%)	

Legenda: N= número total, Teste Qui-Quadrado, \*Teste Exato de Fisher,  $p < 0,05$  – diferença estatística significativa.

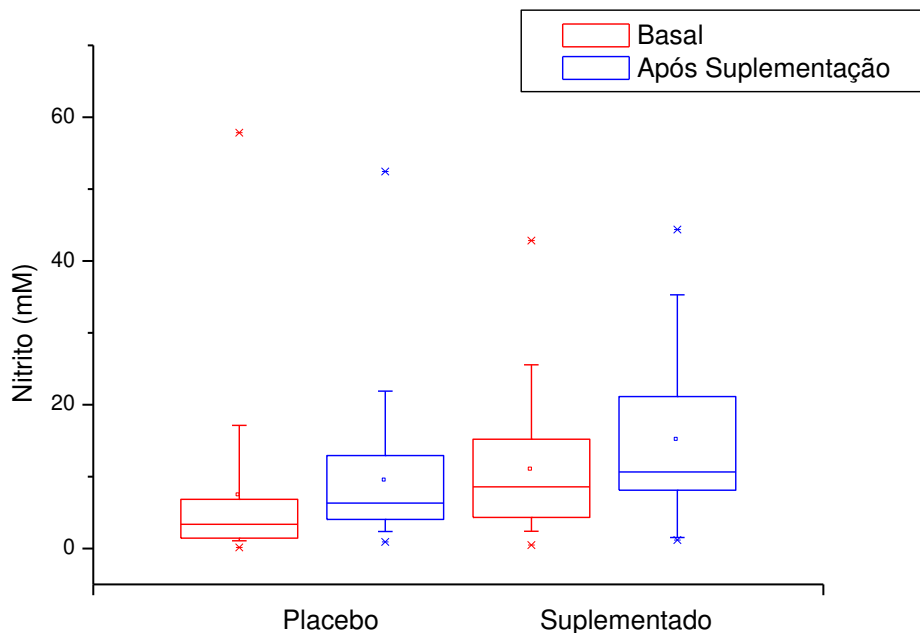
### 5.2.1 Avaliação do Estresse Oxidativo

A Figura 12 demonstra a comparação das concentrações plasmáticas de capacidade antioxidante total dos grupos placebo e suplementado no tempo basal e após suplementação. As médias  $\pm$  desvio padrão foram, respectivamente: Basal:  $2,2 \pm 1,1$  mMol/L e  $2,3 \pm 1,2$  mMol/L; Após suplementação:  $1,9 \pm 0,7$  mMol/L e  $2,4 \pm 0,3$  mMol/L). Não existiu diferença estatística entre os grupos.



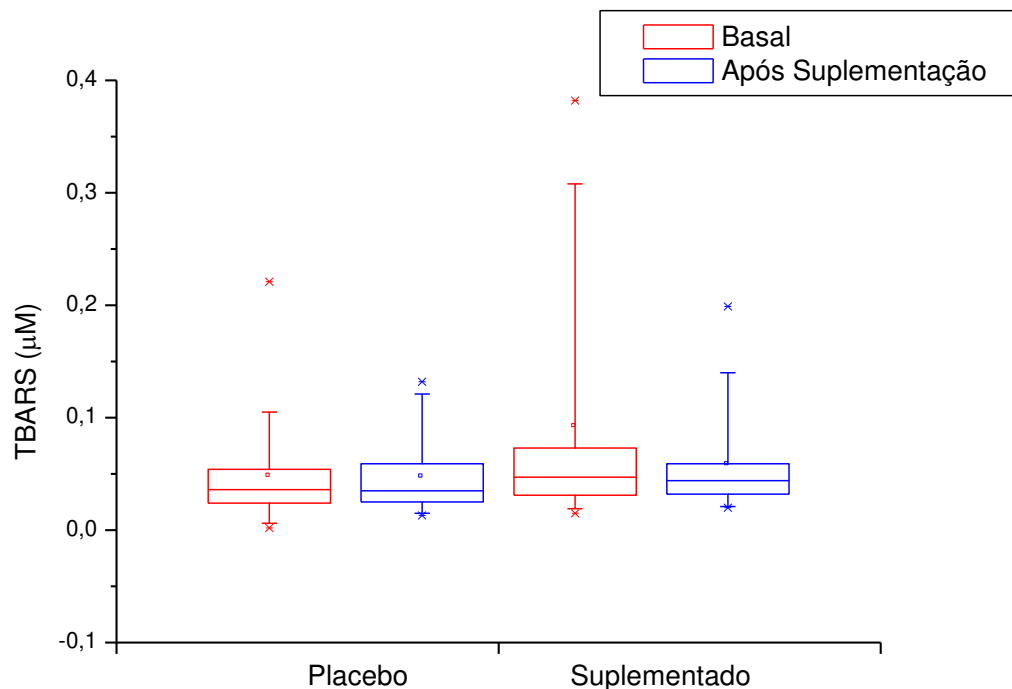
**Figura 12.** Capacidade Antioxidante Total dos grupos placebo (n = 34) e suplementado (n = 26) no período basal e após suplementação. Legenda: Teste Teste ANOVA para medidas repetidas. Não existiu diferença estatística significativa.

A Figura 13 demonstra a comparação da concentração plasmática de nitrito dos grupos placebo e suplementado no tempo basal e após suplementação. As médias  $\pm$  desvio padrão foram, respectivamente: Basal:  $7,3 \pm 11,5$  mM e  $10,9 \pm 3,2$  mM; após suplementação:  $9,4 \pm 3,6$  mM e  $15,0 \pm 11,8$  mM. Não existiu diferença estatística entre os grupos.



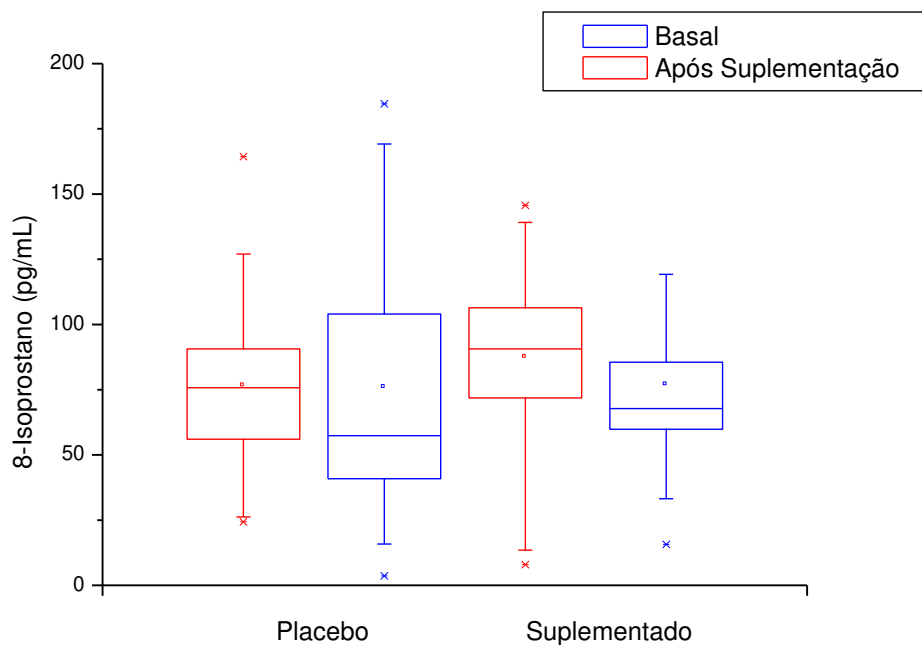
**Figura 13.** Concentração plasmática de Nitrito dos grupos placebo (n = 34) e suplementado (n = 26) no período basal e após suplementação. Legenda: Teste ANOVA para medidas repetidas. Não existiu diferença estatística significativa.

A Figura 14 demonstra a comparação da concentração plasmática de TBARS dos grupos placebo e suplementado no tempo basal e após suplementação. As médias  $\pm$  desvio padrão foram, respectivamente: Basal:  $0,05 \pm 0,04$   $\mu$ M e  $0,09 \pm 0,11$   $\mu$ M; após suplementação:  $0,05 \pm 0,03$   $\mu$ M e  $0,06 \pm 0,04$   $\mu$ M). Não existiu diferença estatística entre os grupos.



**Figura 14.** Concentração plasmática das Espécies Reativas de Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) dos grupos placebo (n = 34) e suplementado (n = 26) no período basal e após suplementação. Legenda: Teste ANOVA para medidas repetidas. Não existiu diferença estatística significativa.

A Figura 15 demonstra a comparação da concentração plasmática de F2-isoprostanos dos grupos placebo e suplementado no tempo basal e após suplementação. As médias  $\pm$  desvio padrão foram, respectivamente: Basal:  $76,4 \pm 34,7$  uM e  $87,3 \pm 37,4$  uM; após suplementação:  $75,8 \pm 50,0$  uM e  $76,8 \pm 44,4$  uM.



**Figura 15.** Concentração plasmática de F2-isoprotanos dos grupos controle (n = 24) e grupos placebo (n = 34) e suplementado (n = 26) no período basal e após suplementação. Legenda: Teste ANOVA para medidas repetidas. a = diferença estatística significativa (p < 0,005).

Como visto na fase 1 do trabalho, as concentrações de F2-isoprostanos do grupo caso, e conseqüentemente do grupo placebo e grupo suplementado, tanto no período basal como no período após suplementação estavam elevadas quando comparadas com o grupo controle, com diferença estatística significativa, sugerindo a manutenção de um estado oxidante nestes grupos.

Esperava-se que a suplementação com os antioxidantes proposta fizesse com que as concentrações de F2-isoprostanos no grupo suplementado voltassem as concentrações parecidas com o grupo controle; o grupo suplementado apresentou uma queda, que talvez pelo número pequeno de indivíduos e/ou pelo tempo de suplementação de 2 meses ser reduzido, não conseguimos obter uma redução mais importante. O grupo suplementado apresentou, em relação ao tempo basal, para o F2-isoprostano, uma diminuição tanto da média como da mediana e a distribuição do grupo se tornou mais homogênea, o que não aconteceu com o grupo placebo.



## 5.2.2 Avaliação do Estado Nutricional

Os resultados dos parâmetros antropométricos dos grupos placebo e suplementados estão na tabela 13.

**Tabela 13.** Parâmetros antropométricos segundo os grupos placebo e suplementado.

Variáveis	Placebo (n = 34)	Suplementado (n = 26)	Valor de p
<b>Peso (kg)</b>	63,8 ± 10,5	64,8 ± 10,0	0,7670
<b>Altura (m)</b>	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	<b>0,0140*</b>
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	27,0 ± 4,1	25,8 ± 3,2	0,3440
<b>PCT (mm)</b>	18,1 ± 7,4	18,7 ± 8,3	0,9100
<b>CB (cm)</b>	30,0 ± 4,7	30,2 ± 4,2	0,6710
<b>CMB (cm)</b>	24,8 ± 4,0	24,1 ± 4,1	0,7670

Legenda: IMC - Índice de Massa Corporal; PCT- Prega Cutânea Tricipital; CB- Circunferência Branquial; CMB - Circunferência Muscular do Braço. Teste Mann-Whitney, \*p<0,05 Diferença significativa.

Houve diferença significativa quanto a altura entre o grupo placebo e o grupo suplementado.

A classificação do estado nutricional realizada por meio de parâmetros antropométricos como: o índice de massa corporal (IMC), % prega cutânea e % das circunferências estão na Tabela 14.

**Tabela 14.** Avaliação do estado nutricional a partir do índice de massa corporal (IMC), Prega cutânea tricipital (PCT), Circunferência do braço (CB), Circunferência muscular do braço (CMB) dos grupos placebo e suplementado.

Índices Antropométricos	Classificação	Placebo (n = 34)		Suplementado (n = 26)		p
		N	%	N	%	
IMC	Eutrofia	16	47,0	15	57,7	0,4215
	Obesidade	8	23,5	8	30,8	
	Sobrepeso	9	26,5	4	15,4	
PCT	Eutrofia	3	8,8	5	19,2	0,401
	Excesso de massa adiposa	18	52,9	16	61,5	
	Déficit de massa adiposa	10	29,4	8	34,61	
CB	Eutrofia	14	41,2	9	25	0,4481
	Excesso de massa magra/adiposa	11	32,3	13	50	
	Déficit de massa magra/adiposa	9	26,5	11	42,3	
CMB	Eutrofia	11	32,3	8	30,76	0,3787
	Excesso de massa magra	13	38,2	8	30,7	
	Déficit de massa magra	9	26,5	11	42,3	

N = número de sujeitos. Teste Qui-quadrado, \*Teste Exato de Fisher,  $p < 0,05$  - diferença significativa.

Os indicadores nutricionais IMC, PCT, CB e CMB não diferiram estatisticamente entre os grupos placebo e suplementado. O diagnóstico nutricional pelo IMC mostrou predominância de eutrofia nos grupos placebo e suplementado.

### ***Análise da dieta quanto aos nutrientes antioxidantes***

As concentrações dietéticas dos nutrientes antioxidantes ajustadas pela energia nos grupos placebo e suplementado estão expostas na tabela 15.

**Tabela 15.** Concentrações dietéticas médias e desvios padrão do consumo de nutrientes antioxidantes na dieta habitual do grupo placebo e suplementado.

Parâmetros	Placebo (n=30)	Suplementado (n=26)	EAR <sup>#</sup>	P
Vitamina A (µg)	705,3 ± 778,6	428,2 ± 232,4	625	0,8800
Vitamina C (mg)	55,7 ± 47,6	54,2 ± 46,5	75	0,7300
Vitamina E (mg)	9,0 ± 4,0	9,9 ± 9,3	12	0,6100
Cobre (µg)	950,0 ± 510,0	870,0 ± 280,0	700	0,0700
Zinco (mg)	7,1 ± 4,4	5,8 ± 2,4	9,4	0,1300
Selênio (µg)	79,8 ± 47,4	76,9 ± 21,5	45	0,1900

Legenda: EAR Estimativa de requerimento médio diferente para sexos (Vitamina A 625 µg masculino/d; 500 µg/d feminino. Zinco 9,4mg/d sexo masculino; 6,8mg/d sexo feminino. Vitamina C 75mg masculino e 60mg/d feminino). Teste de Mann-Whitney diferença não significativa ( $p>0,05$ ). Concentrações dietéticas dos nutrientes ajustados pela energia.

As concentrações dietéticas médias do mineral selênio e do mineral cobre ultrapassaram a EAR no grupo placebo e suplementado e a ingestão média da vitamina A foi superior a EAR no grupo placebo. Os valores médios de ingestão dos demais nutrientes analisados estavam inferiores aos valores da EAR, não alcançando, portanto, a cobertura nutricional preconizada. As médias de consumo de nutrientes antioxidantes não alcançaram diferença estatística significativa entre os grupos placebo e suplementado.



## 6. DISCUSSÃO





Neste estudo foi avaliado o estresse oxidativo em indivíduos saudáveis e de pacientes que apresentaram e câncer de pele não melanoma, assim como foi investigado o efeito da suplementação de vitaminas C, E e mineral zinco no estresse oxidativo desses pacientes.

A localização mais prevalente dos tumores cutâneos neste estudo foi na face. Sabe-se que a maior intensidade dos danos oxidativos tende a ocorrer em áreas mais expostas as RUVs, assim, a face é um local do corpo bastante exposto as RUVs, e elas induzem à produção de EROs e ERNs, que em condições excessivas rompem o equilíbrio oxidante/antioxidante, sendo responsável por danos na pele. Tais resultados se compatibilizaram com os estudos de Becker *et al.*<sup>(126)</sup> e Borsato e Nunes<sup>(127)</sup>.

Outro aspecto a ser discutido diz respeito a esperada predominância de CBC em relação ao CEC, pois como sabemos o CBC representa o câncer de pele mais comum, correspondendo a 70% das neoplasias cutâneas<sup>(1)</sup>, esses resultados se combatibilizaram com Ferreira *et al.*<sup>(24)</sup>.

Quanto às características sociodemográficas e hábitos de vida dos sujeitos, não houve diferença estatística significativa quanto as variáveis: sexo, cor de pele, uso de bebidas alcoólicas e fumo entre os grupos caso e controle, com frequências mais elevadas de sexo feminino, cor de pele parda, não uso de bebidas alcoólicas e de fumo. Por outro lado, variáveis como o tempo de exposição ao sol, o uso de bloqueador solar e antecedentes familiares para câncer apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos, com frequências superiores no grupo caso.

Os sujeitos que integravam o grupo caso concentraram-se na faixa etária superior a 60 anos e no sexo feminino, semelhante aos resultados de Campos *et al.*<sup>(128)</sup>, Becher *et al.*<sup>(126)</sup>, Spindola *et al.*<sup>(129)</sup> e ainda Rocha *et al.*<sup>(130)</sup>, os quais desenvolveram estudos também em pacientes com CPNM.

Esse resultado se deve ao fato de que, com o avanço da idade, ocorre aumento na produção de ERO e ERNs, depressão do sistema imune e redução dos mecanismos de reparo do DNA, além dos efeitos da exposição solar cumulativa ao longo da vida <sup>(127)</sup>, aumentando assim a vulnerabilidade ao CPNM.

Outro aspecto a ser mencionado é a prevalência do sexo feminino, que se deve à busca mais precoce dos serviços de saúde pelas mulheres, deixando-as mais conscientes do próprio corpo e ainda por constituírem o público-alvo de várias campanhas educacionais contra o câncer, alertando-as do problema, dos seus fatores de risco e das possíveis manifestações.

Sobre a cor da pele dos sujeitos, os resultados mostraram maior frequência de cor de pele parda, encontrando respaldo no trabalho desenvolvido por Prado <sup>(131)</sup>, também no estado do Piauí. Esperava-se que uma maior parcela dos pacientes com CPNM apresentasse cor de pele branca, a qual é mais vulnerável aos danos oxidativos, no entanto, é importante ressaltar que 71,8% da população do estado do Piauí apresentam cor de pele parda, de acordo com Pesquisa Nacional por Amostra de domicílios (PNAD) (2011) <sup>(132)</sup>, e ainda o fator regional não pode ser desconsiderado na avaliação deste resultado, tanto assim que nos estudos de Sampaio e Cardoso <sup>(106)</sup>, realizado no Distrito Federal, de Mantese *et al.* <sup>(133)</sup> realizado em Londrina e de Popim *et al.* <sup>(20)</sup>, em Botucatu, a cor de pele branca foi a mais prevalente.

E ainda o hábito de fumar foi referido por 13,33% do grupo caso, o que pode ter contribuído para a ocorrência do CPNM, pois o fumo pode alterar os marcadores de estresse oxidativo, oxidar os grupos tióis das proteínas, aumentar os níveis plasmáticos dos grupos carbonila, aumentar a geração de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina e provocar depleção das defesas antioxidantes, por induzir redução dos níveis de vitaminas C e E <sup>(42)</sup>. Campos *et al.* <sup>(128)</sup> apresentaram resultados que reforçam o tabagismo como importante fator de risco na patogênese do câncer de pele.



A despeito da homogeneidade entre os grupos placebo e suplementado com relação às diversas características estudadas, o uso de álcool mostrou diferença estatística significativa entre os grupos, mostrando-se mais acentuado no grupo suplementado. Tal uso atuaria favorecendo o estresse oxidativo, acarretando danos diretos ou ainda mediados por seus metabólitos secundários. E ainda o metabolismo do etanol pode estar diretamente envolvido na geração de EROs e ERNs, bem como na depleção dos componentes do sistema antioxidante e aumento nos níveis de marcadores específicos <sup>(42)</sup>.

Os resultados referentes à influência do álcool e fumo entre os casos e controles não apresentaram associação significativa com o desfecho CPNM, corroborando com Rocha *et al.*<sup>(130)</sup>, os quais sugeriram que fatores socioeconômicos podem se associar a essa doença na determinação dos riscos ou proteção a ela, em decorrência do tipo de trabalho ou dos hábitos de lazer.

O grupo caso referiu tempo de exposição ao sol estatisticamente superior ao controle, refletindo a ação nociva das RUV sobre o equilíbrio redox da pele dos casos. Já os grupo suplementado e placebo apresentaram comportamento semelhante quanto ao tempo de exposição ao sol, superior a 60 minutos ao dia. Tais resultados alinhavam-se a literatura. Popim *et al.* <sup>(20)</sup> enfatizam que uma importante parcela da população brasileira expõe-se muito ao sol e de forma descuidada, seja por trabalho ou lazer e o país situa-se numa zona de alta incidência de raios ultravioleta, portanto, nada mais previsível que a alta incidência de câncer de pele.

A exposição ao sol na fase adulta, referida nos relatos dos sujeitos que tiveram CPNM, permitiu sinalizar para os efeitos cumulativos do sol sobre a pele, apesar de apresentarem ocupações atuais não relacionadas à exposição solar direta, o que se mostrou compatível com as conclusões de Campos *et al.* <sup>(128)</sup>. Sampaio e Cardoso <sup>(106)</sup> sugerem que essas neoplasias estejam relacionadas a exposições solares intermitentes intensas, especialmente antes dos 20 anos, ou seja, muita exposição solar na infância e pouca na vida adulta.

A média de idade do grupo caso foi semelhante ao estudo de Fabris *et al.*<sup>(134)</sup>, que mostra que à medida em que a idade avançava, reduzia o tempo de exposição ao sol; portanto, os mais expressivos índices de fotoexposição concentravam-se na faixa etária abaixo de 40 anos.

Em função da média de idade do grupo caso ter sido superior a 60 anos, do fato deles residirem em uma cidade situada na região nordeste do Brasil, com fortes índices de radiação UVA e UVB, temperaturas elevadas praticamente o ano todo e de terem sido previamente diagnosticados e tratados para o CPNM, esperava-se que o tempo de exposição solar atual fosse reduzido, conforme concluiu o estudo de Fabris *et al.*<sup>(134)</sup>, no entanto o que se observou foi um tempo de exposição solar tanto no grupo placebo quanto no grupo suplementado superior a 120 minutos ao dia, portanto impróprio às condições ambientais, a que estão expostos os sujeitos. Esse dado se compatibilizou com informação contida em “A situação do câncer no Brasil”<sup>(2)</sup>, a qual refere que 65% da população nordeste se expõe ao sol por mais de 30 minutos ao dia, sem proteção solar, fato este que daria suporte as elevadas incidências de CPNM.

Segundo a opinião de Balogh *et al.* (2011)<sup>(135)</sup>, a ação nociva das RUVB sobre a pele provoca danos ao DNA, inflamação, carcinogênese, deflagrando mutações nos dímeros de pirimidina, e é portanto associada ao CPNM: CBC e CEC<sup>(135)</sup>.

A associação entre trabalho e CPNM decorre de que determinadas ocupações exigem intensa e constante exposição a agentes carcinogênicos, em especial, à radiação solar. Nessa perspectiva, Borsato e Nunes<sup>(127)</sup> mostraram que os casos de CPNM ocorreram predominantemente em trabalhadores rurais. Esse achado se compatibilizou com relato dos sujeitos, pelos quais foi possível inferir exercício profissional desprotegido das RUV na fase adulta, devido às atividades rurais exercidas.

De acordo com Chinem e Miot<sup>(136)</sup> ressaltam que a exposição intermitente, principalmente na juventude, mas também a exposição crônica às RUV são fatores constitucionais importantes para o desenvolvimento do CBC, manifestando-se em um período de 10 a 50 anos após a exposição solar.

A presença de antecedentes familiares para câncer dos casos foi estatisticamente superior aos controles, já nos grupos suplementados e placebo, a presença de antecedentes familiares para câncer predominou em ambos. A agregação familiar confere uma vulnerabilidade genética e biológica ao câncer, acarretando maior propensão a este durante toda a vida, refletindo nitidamente a influência da hereditariedade na etiologia do câncer<sup>(137)</sup>.

A associação entre histórico familiar de câncer e a ocorrência do CPNM encontra amparo no fator genético, apto a favorecer o risco de desenvolvimento desses tumores, por induzir determinadas características fenotípicas, síndromes hereditárias e genes determinantes desses tumores. Mas também se deve considerar o fator ambiental, condicionando os membros de uma mesma família a se expor às mesmas condições ambientais, estando, assim, suscetíveis ao desenvolvimento das mesmas doenças<sup>(24)</sup>.

No mesmo sentido dos resultados ora apresentados, Popim *et al.*<sup>(20)</sup> e Ferreira *et al.*<sup>(24)</sup> concluíram que o histórico familiar de câncer foi altamente significativo em seus estudos. Opondo-se aos dados agora expostos, a Campanha de Prevenção de Câncer de Pele, realizada em Teresina (2011)<sup>(7)</sup> não encontrou a história familiar como fator envolvido no CPNM.

O uso de bloqueador solar foi estatisticamente superior no grupo caso. Esse resultado sugere que o uso de bloqueador solar esteve diretamente atrelado ao diagnóstico prévio de CBC ou CEC, que requer a emergência na adoção de medidas terapêuticas, incluindo a proteção a exposição solar.

É de se ressaltar que os sujeitos faziam uso de bloqueador solar de forma irregular, conforme relato dos mesmos. Tais resultados encontraram suporte em

pesquisas conduzidas por Castilho *et al.*<sup>(138)</sup>, Ferreira *et al.*<sup>(24)</sup>, Popim *et al.*<sup>(20)</sup>, as quais constataram uso irregular de bloqueador solar.

Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que as pessoas que fazem uso de algum tipo de proteção solar, ficam despreocupadas quanto à exposição solar, como se a referida proteção as protegessem totalmente dos efeitos deletérios dos raios UVB e UVA sobre a pele, sem levar em consideração alguns aspectos importantes para a eficácia desses meios de proteção, tais como: a frequência e o tempo de exposição ou mesmo o uso adequado dessa proteção em período integral de exposição.

A utilização de protetores solares é a principal abordagem cosmética contra os efeitos nocivos da radiação UV. Balogh *et al.*<sup>(135)</sup> evidenciam que o uso adequado e regular de fotoprotetores reduz o número de casos de queratose actínica, carcinoma de células escamosas e atenua o desenvolvimento de novos nevos em crianças e evita o envelhecimento precoce da pele<sup>(135)</sup>.

Um aspecto importante diz respeito ao fato de que, além de os indivíduos com prévio diagnóstico de CPNM que utilizavam bloqueador solar o fazerem de forma irregular, 31,7% deles simplesmente não usavam tal produto, quadro agravado pelo alto grau de exposição solar enfrentada pelos habitantes da cidade em questão, podendo-se inferir que os sujeitos ainda não incorporaram medidas preventivas a sua rotina, contribuindo para recidivas relatadas por eles próprios, que se referiram a biópsias de pele anteriores com detecção de CBC e CEC, já removidos.

Prosseguindo na discussão dos resultados, buscamos comparar os parâmetros de estresse oxidativo dos grupos caso e controle. Esses resultados sugerem a influência do evento progresso câncer no estresse oxidativo dos casos (grupo placebo e suplementado), o qual conduziu ao aumento significativo do F2-isoprostano (Figura 10) e aumento nas concentrações de CAOT, TBARS e nitrito (Figuras 7, 8 e 9), sem diferença significativa em relação ao grupo controle, sugerindo um estado pró-oxidativo crônico.

A epiderme contém antioxidantes que ajudam a protegê-la contra os danos causados pelo estresse oxidativo, mas a produção crônica de RL em circunstâncias especiais (excessiva exposição as RUV, câncer de pele), supera os mecanismos de defesa antioxidante, manifestando-se um desequilíbrio em favor dos pró-oxidantes <sup>(139)</sup>, explicando-se a elevação dos parâmetros de estresse oxidativo observados no grupo caso.

Na tentativa de investigar o estresse oxidativo na carcinogênese cutânea, Belli *et al.* <sup>(140)</sup> dosaram o isoprostano na pele exposta ao sol, constatando elevação na concentração de 8-iso-PGF2 $\alpha$  (um tipo de isoprostano) na pele de portadores de CBC em comparação com a pele saudável não exposta ao sol, confirmando estudos anteriores sobre aumento de lipoperoxidação neste tumor. E ainda estes autores demonstraram que o uso tópico de um composto contendo vitamina E foi capaz de reduzir a formação de 8-iso-PGF2 $\alpha$  na pele irradiada por UV, comprovando o papel dos isoprostanos na inflamação induzida por RUV e, eventualmente, na carcinogênese <sup>(140)</sup>.

O nosso estudo dosou o isoprostano no plasma e não na pele, no entanto os resultados obtidos confirmaram o papel deste como marcador do estresse oxidativo, vez que a elevação significativa da sua concentração no grupo caso mostrou que tal grupo apresentava-se em condições de estresse oxidativo crônico em relação ao grupo controle.

A dosagem de F2-Isoprostano é o método mais confiável para avaliar o estado de estresse oxidativo *in vivo* <sup>(86,87)</sup>, fornecendo uma ferramenta importante para explorar o papel do estresse oxidativo na patogênese do CPNM. Nessa perspectiva, estudo conduzido por Kadiiska <sup>(141)</sup> reforça a importância do isoprostano como marcador de estresse oxidativo.

Merece destaque também a quantificação da CAOT em estudos que investigam o estresse oxidativo em determinados quadros patológicos, vez que também é um parâmetro considerado marcador de estresse oxidativo. Sua determinação põe em evidência o estado das defesas antioxidantes <sup>(91,92)</sup>. Confere

uma visão geral das concentrações de antioxidantes nos tecidos, pressupondo-se que, em situações de comprovado estresse oxidativo, como se percebe no CPNM, há mobilização dos antioxidantes para neutralizar a explosão oxidativa, sugerindo um aumento dos mecanismos de defesa antioxidante ao longo do tempo de exposição ao estresse oxidativo. O sistema de defesa antioxidante endógeno é estimulado pelas agressões oxidativas que, por sua vez, provocam uma resposta metabólica de defesa, explicando-se assim as concentrações de CAOT aumentadas dos casos (placebo e suplementado) em relação aos controles.

De acordo com a opinião de Yet *et al.* <sup>(142)</sup>, em situações de aumento na produção de espécies reativas, verifica-se um aumento compensatório na atividade do sistema de defesa antioxidante no organismo dos pacientes; e em seu estudo detectaram aumento na atividade do sistema de antioxidante em portadoras de câncer de mama, o que também observamos quando comparamos o grupo controle com o grupo casos, apesar de não ser significativo estatisticamente.

Opondo-se aos resultados de CAOT ora apresentados, Kusano e Ferrari<sup>(91,92)</sup> constataram que pacientes com câncer de mama apresentam mais intensa peroxidação lipídica e mais baixa concentração de CAOT, e ainda evidenciaram que mulheres com mais elevadas concentrações séricas de CAOT, apresentavam 53% menos risco de desenvolver câncer de mama.

Um aspecto a considerar na incidência do CPNM se refere à suscetibilidade individual, que está relacionada à quantidade de melanina na pele e a sensibilidade desta em se bronzear ou se queimar em resposta à exposição à RUV <sup>(5)</sup>, explicando a influência de fatores genéticos e da história familiar de câncer na incidência desse tipo de câncer; no entanto, merece destaque a influência da exposição à RUV e ainda de fatores constitucionais e comportamentais na carcinogênese cutânea, os quais em associação, podem ter contribuído para o perfil pró-oxidante constatado no grupo caso, que poderia explicar o diagnóstico progressivo de CPNM, assim como as recidivas. Fatores

como: excesso de peso, idade avançada, inadequada exposição ao sol, uso de fumo e álcool podem explicar a elevação dos marcadores de estresse oxidativo (TBARS, nitrito e CAOT) e a elevação estatisticamente significativa de F2-isoprostano dos casos (Figura 10).

Dentre os fatores constitucionais que poderiam contribuir para o perfil pró-oxidante está o sobrepeso. Os valores de IMC do grupo caso sinalizavam para excesso de peso. Terra e Boschini<sup>(143)</sup> postulam que o mais baixo peso corporal conduz a mais baixa temperatura corporal, queda da glicemia e da taxa metabólica, associado a uma redução do metabolismo celular, que teria como consequência uma menor produção de radicais livres, levando a um menor dano celular e menor estresse fisiológico.

A associação entre IMC e marcadores de estresse oxidativo (MEO) decorre do fato de que o acúmulo de tecido adiposo induz ao aumento na produção de EROs e ERNs, desencadeando o estresse oxidativo e assim, contribuindo para elevação dos MEO. No sentido dos resultados ora apresentados, Furukawa *et al.*<sup>(144)</sup> constataram que os marcadores de peroxidação lipídica (TBARS e 8-epi-PGF2) estavam diretamente correlacionados com IMC e a circunferência da cintura (CC), e na tentativa de relacionar a perda de peso com atenuação do estresse oxidativo e do processo inflamatório, Silva<sup>(145)</sup> constatou redução dos valores de TBARS e dos metabólicos do óxido nítrico em pacientes após gastroplastia.

A idade como fator constitucional também poderia contribuir para o perfil pró-oxidante do grupo caso (placebo e suplementado) em relação ao grupo controle, vez que à medida que a idade avança, a quantidade total de antioxidantes no plasma começa a diminuir e a quantidade de ERO e ERN aumenta<sup>(146)</sup>.

Outro fator de exposição e comportamental que poderia contribuir para o perfil pró-oxidante do grupo caso (placebo e suplementado) em relação ao grupo controle foi o tempo superior de exposição solar nos casos. Tais resultados se

compatibilizaram com trabalho conduzido por Kuhn *et al.* <sup>(147)</sup>, que atribuíram a elevação nas concentrações de isoprostano a maior exposição solar.

Conforme foi visto, o tempo de exposição solar foi estatisticamente superior no grupo caso, sugerindo a influência da exposição à RUV na carcinogênese cutânea, cuja ação, de acordo com a posição dos autores Ichihashi *et al.* <sup>(10)</sup>, Bickers e Athar <sup>(80)</sup> e Pandet *et al.* <sup>(139)</sup>, decorre da produção de RL, de uma variedade de efeitos adversos no sistema imune, com supressão da resposta imune sistêmica e cutânea, a qual contribui para a progressão do tumor; as RUV podem ainda provocar mutagênese do DNA epidérmico, pois criam um ambiente oxidante que potencializa as mutações oncogênicas, podem induzir a ativação de peróxidos ou  $^1O_2$ , fatores de transcrição, incluindo o fator AP-1, na pele humana. Assim sendo, a exposição crônica às RUVs provoca danos na pele humana, o que requer a funcionalidade dos mecanismos de defesa antioxidante desta para frear tais danos oxidativos e restabelecer o equilíbrio redox da pele.

Em relação ao fumo, 83,3% dos casos fumaram em alguma época de suas vidas e 13,3% ainda fumam, diferenciando-se do grupo controle, no qual 75,0% nunca fumaram, podendo-se inferir sobre os efeitos do tabagismo na elevação dos marcadores daqueles. A influência do tabagismo sobre o nível dos MEO foi salientada por Morrow *et al.* <sup>(148)</sup>, que constataram elevação dos níveis de F2-isoprostano na circulação de fumantes e também por Lykkesleldt <sup>(149)</sup>, que correlacionou positivamente os níveis dos marcadores de peroxidação lipídica: TBARS e MDA com o hábito de fumar.

Cerca de 15% dos casos faziam uso de bebidas alcoólicas e, como se conhece os efeitos do álcool sobre os MEO, é de se supor que tal hábito poderia contribuir para o perfil pró-oxidante constatado no estudo. Segundo Huang *et al.* <sup>(65)</sup> os níveis séricos significativamente maiores de MDA e menor atividade da SOD associaram-se ao uso de bebida alcoólica.

Nos estudos envolvendo a quantificação dos MEO no câncer constata-se a elevação desses marcadores, reforçando o papel do estresse oxidativo como



mecanismo envolvido no desencadeamento de diversos tipos de câncer. Estudo conduzido por Barocas *et al.* <sup>(150)</sup> sugeriu que o nível de F2-isoprastano é maior em homens com neoplasia intraepitelial prostática de alto grau, destacando o papel deste como biomarcador de estresse oxidativo na carcinogênese da próstata, mas também pode ser utilizado para estimar a eficácia de intervenções que visam controlar o estresse oxidativo na prevenção ou tratamento do câncer de próstata. Estudo conduzido por Aghvami *et al.* <sup>(151)</sup> observou que o nível de MDA foi significativamente mais elevado em pacientes com câncer de mama, atribuindo-se à maior produção de EROs ou deficiência de defesas antioxidantes.

Estudo de Yeh *et al.* <sup>(142)</sup> observou concentrações de TBARS aumentadas no plasma de pacientes com neoplasia mamária, assim como aumento na atividade de enzimas antioxidantes. Rockenbach <sup>(152)</sup> evidenciou o impacto do câncer de mama e/ou tratamento sobre aumento do estresse oxidativo no grupo de mulheres, verificado por meio da redução significativa dos marcadores de defesa antioxidante (FRAP e GSH) e na elevação das concentrações dos marcadores de oxidação lipídica (TBARS e FOX) sanguíneos após o término do tratamento.

Rajneesh *et al.* <sup>(153)</sup> constataram aumento significativo da peroxidação lipídica, como evidenciado pelo nível de TBARS e *status* antioxidante, tais como: SOD, CAT, GPx, GSH e GST elevados em amostras de pacientes com câncer de mama em comparação aos do grupo controle.

Em função do perfil pró-oxidativo do grupo caso, o estudo buscou analisar a influência da suplementação de micronutrientes com propriedades antioxidantes nesses indivíduos. Há evidências substanciais de que o aumento do estresse oxidativo, guarda estreita associação com carcinogênese cutânea, e que a suplementação com antioxidantes pode desempenhar um papel modulador no efeito agudo do estresse oxidativo.

O objetivo do estudo encontra respaldo na necessidade de conhecer as alterações no perfil oxidativo dos sujeitos da pesquisa com a suplementação

combinada desses micronutrientes, a fim de consolidar a adoção de medidas preventivas aptas a minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo sobre a integridade e equilíbrio redox cutâneo.

Como se sabe, as moléculas de DNA da pele são constantemente "bombardeadas" por EROs e ERNs, produzidas endogenamente, como também geradas pela ação de agentes ambientais e de fontes de radiação, e os antioxidantes podem agir removendo os radicais livres e reforçando os sistemas de reparo do DNA, acionando enzimas envolvidas na regulação gênica pós-transcricional de fatores de transcrição<sup>(14,154)</sup>. Os antioxidantes atenuam os danos provocados pelos RL, ERO e ERN e podem prevenir ou reverter muito eventos que contribuem para a toxicidade da epiderme e doenças de pele<sup>(50)</sup>, assim a suplementação de antioxidantes representa uma estratégia promissora na prevenção dos danos oxidativos da pele.

Em nosso estudo, com a suplementação de antioxidantes pôde-se visualizar redução na concentração dos marcadores TBARS, CAOT e F2-isoprostano, reforçando assim os efeitos positivos desta suplementação na atenuação do EO. Esperava-se que a suplementação proposta propiciasse uma proteção antioxidante mais efetiva, com resultados que traduzissem reduções significativas dos marcadores, especificamente, que as concentrações de F2-isoprostanos (marcador que apresentou aumento significativo quando comparados os grupos caso e controle) no grupo suplementado voltassem às concentrações próximas ao grupo controle.

Houve redução de aproximadamente 12,1% nas concentrações de isoprostano com a suplementação de antioxidantes. Esse dado permitiu constatar o impacto positivo da suplementação de antioxidantes na atenuação do estresse oxidativo; no entanto, os valores séricos de isoprostano após suplementação ainda se mantiveram superiores ao grupo controle.

Fatores como número reduzido de indivíduos, tempo de suplementação de dois meses, doses utilizadas e outros podem ter contribuído para os resultados,

sugerindo que o *status* antioxidante requer mais tempo de suplementação ou doses de antioxidantes maiores ou suplementação isolada de determinado antioxidante para o seu restabelecimento.

Deve-se ressaltar que o papel desempenhado pelos antioxidantes *in vivo* na proteção aos danos oxidativos depende de doses ideais para obter a proteção e de suas concentrações nos sítios de ação no início e durante o estresse oxidativo. Assim, é possível que as doses usadas não tenham sido suficientes para induzir uma resposta mais eficaz, e os níveis basais dos antioxidantes não favoreceram uma mais efetiva ação antioxidante, vez que quanto mais debilitados fossem seus níveis basais, mais eficaz seria a terapia antioxidante. Além de que um antioxidante pode atuar como protetor em determinado sistema, mas pode falhar na proteção ou mesmo aumentar as lesões induzidas em outros sistemas ou tecidos (28, 29, 30).

Nesta perspectiva, embora as defesas antioxidantes sejam efetivas, não são infalíveis, sobretudo em situação de marcante desequilíbrio entre as substâncias antioxidantes e a formação desenfreada de ERO e ERN, como no câncer de pele. Salienta-se que a ação preventiva de antioxidantes pode ocorrer precocemente na progressão da doença, mas ser ineficaz posteriormente. Assim, indivíduos de grupos identificados como de alto risco podem ser resistentes aos suplementos<sup>(17)</sup>.

Uma questão-chave na realização de um estudo de intervenção com um antioxidante, é a de estabelecer se o tratamento diminui o estresse oxidativo em sujeitos do estudo e em que dose (s). A determinação do nível de peroxidação lipídica, como refletido pela concentração de F2-isoprastano em fluidos biológicos, pode ajudar a identificar os pacientes com maior probabilidade de se beneficiar do tratamento com antioxidante<sup>(86,87)</sup>. Assim, a quantificação dos marcadores de estresse oxidativo pode ser usada para monitorar a eficiência protetora exercida pelos antioxidantes em estudos de intervenção com suplementação de antioxidantes<sup>(87)</sup>.

Alinhando-se aos resultados atuais, Dietrich *et al.*<sup>(155)</sup> constatou redução nas concentrações de marcadores de peroxidação lipídica em indivíduos fumantes e obesos com a suplementação de vitamina C; Rabovsky *et al.*<sup>(156)</sup> constataram redução na formação de F2-isoprostano, com a suplementação de antioxidantes, por outro lado, não houve efeito quando avaliaram a proteção antioxidante exercida pela CAOT. Alinhando-se ainda aos nossos resultados, Qi Dai e Xiangzhu<sup>(157)</sup> e Ho E *et al.*<sup>(158)</sup> evidenciaram redução significativa nos níveis de F2 isoprostano e de 5 isoprostano com a suplementação de 800UI de vitamina E em pacientes com câncer de mama e distúrbios cardiovasculares respectivamente.

A despeito da função antioxidante dos nutrientes suplementados, os resultados de pesquisas que buscam associar tal suplementação à redução do estresse oxidativo oferecem resultados inconclusos, como é o caso da pesquisa conduzida por Preziosi *et al.*<sup>(159)</sup>, que comprovaram aumento significativo na atividade da GPx no plasma e eritrócitos nos grupos que receberam a suplementação com antioxidantes; mas não constataram modificações nas concentrações de MDA, após 6 meses de suplementação. E ainda pesquisa conduzida por Huang *et al.*<sup>(65)</sup>, na qual não foi observado efeito sinérgico entre a ação das vitaminas C e E em nenhum dos marcadores avaliados: MDA ( $p=0,46$ ), F2-isoprostanos ( $p=0,23$ ) e CAOT ( $p=0,13$ ), e somente a vitamina C provocou aumento significativo na CAOT ( $p=0,001$ ). No mesmo sentido, Meagher *et al.*<sup>(160)</sup> avaliaram, em adultos saudáveis, o efeito da suplementação de vitamina E durante oito semanas, em diferentes dosagens e nenhuma das dosagens relacionadas foi capaz de exercer efeito sobre os níveis urinários de F2-isoprostanos.

Retratando ainda a controvérsia da suplementação de nutrientes antioxidantes no estresse oxidativo em pacientes com câncer colorretal, um estudo conduzido por Hopkins *et al.*<sup>(161)</sup> demonstrou redução na concentração de F2-isoprostano em não fumantes que receberam suplementação, mas elevação em

fumantes, embora estes resultados não mostrassem associação estatística significativa, sugerindo a influência do tabagismo nos biomarcadores de estresse oxidativo

Tendo em vista a necessidade de se buscar novos formatos terapêuticos para as doenças da pele, crescem os estudos que investigam os efeitos da suplementação de antioxidantes nos MEO e nas condições da pele, e os resultados mostram uma tendência de benefícios com o uso de antioxidantes. Nas pesquisas de McArdle et al <sup>(162,163)</sup> envolvendo a suplementação de ácido ascórbico por 8 semanas não foi observada melhoria no eritema induzido por RUV, mas provocou redução nos níveis de MDA da pele e surpreendentemente também provocou redução no conteúdo de glutathiona e tióis proteicos da pele. Os autores sugerem que tais efeitos podem ser devido à regulação da capacidade redutora total das células da pele. Mas quando investigavam a suplementação de  $\beta$  caroteno, não apresentaram evidências que respaldassem a redução da peroxidação lipídica induzida por este, concluindo que o possível papel fotoprotetor do  $\beta$  caroteno reflete a ação conjunta de outros fatores dietéticos. E ainda pesquisa conduzida por Belli et al <sup>(140)</sup> constatou que o tratamento com vitamina E induziu redução nos níveis de 8 iso-PGF2 alfa na pele exposta ao sol, confirmando a função da vitamina E como antioxidante.

No mesmo sentido, Ritter et al <sup>(164)</sup> verificaram que o tratamento com vitamina E provocou redução das células “sunburns” da pele (queratinócitos expostos a RUV), quer por sua ação direta sequestrando os radicais livres ou por ação indireta, aumentando a espessura da epiderme. Sugerem que novos estudos em modelos clinicamente relevantes sejam realizados para definir a dose ideal de vitamina E, a frequência de administração, o veículo, e a quantificação dos possíveis efeitos protetores oferecidos para as células de Langerhans <sup>(154,164)</sup>.

Um aspecto que merece ser analisado diz respeito à duração da suplementação e a combinação de antioxidantes para dimensionar os efeitos antioxidantes. Estudo mostrou que a suplementação com  $\beta$  caroteno por 10

semanas pôde proporcionar fotoproteção, e a suplementação combinada de  $\beta$  caroteno e vitamina E por 12 semanas diminuiu o eritema <sup>(165)</sup>. E ainda de acordo com Heinrich *et al.* <sup>(166)</sup>, a suplementação oral de  $\beta$  caroteno ou de um mix de carotenóides provocou elevação nos níveis de  $\beta$  caroteno na pele e redução da intensidade do eritema, quando a pele era exposta ao sol.

Há vários estudos que investigam os efeitos da suplementação de nutrientes antioxidantes na incidência e risco de CPNM: CBC e CEC e os resultados não mostram evidências significativas que respaldassem a suplementação de antioxidantes como estratégia preventiva do CPNM. Nessa perspectiva, Karagas *et al.* <sup>(167)</sup> concluíram pela limitada influência de fatores dietéticos no risco de CBC, pois seus resultados não mostraram efeitos protetores significativos do selênio,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno na prevenção do câncer de pele. Porém, reforçam que a adoção de medidas nutricionais de prevenção poderia ser extremamente valiosa, particularmente tendo em conta o aumento rápido da taxa de incidência desse tipo de câncer.

No mesmo sentido, Hercberg *et al.* <sup>(168)</sup> e o estudo SUVIMAX (França) <sup>(15)</sup> não constatarem efeitos positivos da suplementação de antioxidantes na incidência de câncer de pele em mulheres, somente em homens foi possível verificar efeitos positivos, ressaltam que tais resultados podem ser atribuídos, em parte, às diferenças no metabolismo dos nutrientes entre os gêneros e também ao *status* antioxidante endógeno antes da suplementação, vez que a população masculina apresentava níveis basais de antioxidantes debilitados, especialmente de  $\beta$ caroteno, sugerindo que a suplementação com micronutrientes antioxidantes corrigiu esses níveis e protegeu os indivíduos de danos associados à ação de RL e EROs <sup>(15)</sup>. Embora a base molecular para esta diferença metabólica seja mal caracterizada, pode resultar da influência hormonal na expressão de genes que codificam os transportadores celulares <sup>(15,168)</sup>.

Continuando na mesma direção, estudo conduzido por Greenberg *et al.* <sup>(154,169)</sup> e estudo conduzido por Hennekens *et al.* <sup>(154,170)</sup> não

mostraram evidências significativas que respaldassem a suplementação de antioxidantes como estratégia preventiva do CPNM. De acordo com estudo de Burns et al.<sup>(16)</sup>, o tratamento tópico com a vitamina E não apresentou benefícios, e, de fato, resultou num aumento global de danos ao DNA, delineando-se uma tendência de aumentar a incidência, a carga e taxa de crescimento do câncer de pele, possivelmente devido aos efeitos pró-oxidante da suplementação crônica na pele danificada<sup>(16)</sup>.

Segundo McNaughton *et al.*<sup>(171)</sup> a evidência de associação entre a vitamina E, a vitamina C e selênio e ambos nos CBC e CEC é fraca. Os estudos envolvendo a investigação dos efeitos da suplementação combinada de antioxidantes no desenvolvimento de CPNM apresentam limitações, tornam-se necessários estudos bem desenhados para esclarecer o papel da dieta no CPNM<sup>(171)</sup>.

Os autores sugerem que os resultados inconclusos desses estudos decorram das limitações: inadequada avaliação dos hábitos alimentares, devido aos possíveis vieses de memória, dados epidemiológicos de incidência e registros confiáveis, análise combinada de CBC e CEC, a falta de ajuste para potenciais fatores de confusão e falta de estudos de base populacional<sup>(186)</sup>. Para superar essas limitações são requeridos estudos epidemiológicos de alta qualidade com diagnóstico adequado do câncer estudado e, sobretudo ajuste para fatores de confusão. Devem ser considerados os diferentes fatores passíveis de interferir na ação dos fatores dietéticos no desenvolvimento de CP. Além disso, existem fatores dietéticos que apresentam potencial anticancerígeno que não foram substancialmente investigados com relação ao câncer de pele, incluindo flavonóides, polifenóis, ácido fólico, vitamina D, cumarinas, riboflavina<sup>(171)</sup>.

As controvérsias se fazem notar também quando se pesquisam outros tipos de câncer. Albanes *et al.*<sup>(172)</sup> concluíram que a suplementação com  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno não preveniu o câncer de pulmão em homens mais velhos e fumantes. A suplementação de  $\beta$ -caroteno em níveis farmacológicos pode modestamente

umentar a incidência de câncer de pulmão em fumantes, e este efeito pode estar associado ao tabagismo e ao maior consumo de álcool. Neste sentido, os resultados de Kirsh *et al.* <sup>(173)</sup> não garantem forte suporte à população quanto à suplementação com antioxidantes em altas doses para a prevenção do câncer da próstata. No entanto, a suplementação de vitamina E em fumantes do sexo masculino e a suplementação de  $\beta$ -caroteno em homens com baixa ingestão dietética de  $\beta$ -caroteno foram associados a um risco reduzido da doença.

Dolara *et al.* <sup>(174)</sup> e Myung *et al.* <sup>(175)</sup> não demonstraram efeitos positivos da suplementação de antioxidantes sobre a incidência e mortalidade por câncer ou um efeito prejudicial sobre ambos. Os suplementos de antioxidantes até agora testados não parecem oferecer melhoria em relação a uma dieta bem equilibrada, possivelmente devido à escolha das substâncias testadas ou devido à dosagem excessiva. De acordo com Choi *et al.* <sup>(176)</sup> a suplementação de antioxidantes não impulsionou efeito protetor sobre os danos do DNA ou sobre a peroxidação lipídica e não foi observada evidência de uma interação sinérgica ou cooperativa entre as vitaminas C e E.

A controvérsia verificada pela apreciação dos estudos antes mencionados encontra suporte numa variedade de fatores não previstos e nem determinados, que podem exercer influência nos resultados, como: tabagismo, uso de bebidas alcoólicas, duração da suplementação, doses suplementadas, coquetel de antioxidantes ou uso isolado de antioxidantes, ingestão dietética e níveis basais de antioxidantes.

Neste ponto dos resultados, buscamos correlacionar os parâmetros antropométricos (IMC e PCT) e dados demográficos com os parâmetros de estresse oxidativo. Os resultados das correlações apresentadas mostraram que tanto para o grupo caso como para o grupo controle não existiram correlações significativas. Quando os grupos foram randomizados, realizamos novamente análise de correlação do tempo basal com os parâmetros de estresse oxidativo e dados demográficos e antropométricos, os resultados apontaram algumas



correlações fracas e moderadas, mas sugere-se que foi ao acaso, uma vez que no período basal este grupo não havia passado por intervenção e o grupo maior (os dois grupos juntos) não apresentou correlações.

Em relação aos grupos placebo e suplementado após intervenção, os resultados mostraram que o peso e o PCT influenciaram os valores de isoprostanos, ou seja, quanto maior o peso e/ou o valor de PCT, maior o valor de isoprostano, o que pode sugerir que a suplementação de antioxidantes e a reeducação alimentar para redução de peso e PCT, poderiam ajudar em uma melhor resposta ao estresse oxidativo.

A associação entre IMC, PCT e isoprostano pode ser explicada devido ao acúmulo de tecido adiposo constatado em maiores valores de IMC e PCT, induzindo aumento na produção de ERO e ERN, com conseqüente elevação nas concentrações de isoprostano. Reforçando essa associação, Qi Dai e Zhu Xiangzhu <sup>(157)</sup> descobriram que mulheres com sobrepeso ou obesas com câncer de mama apresentam mais elevadas concentrações de isoprostano, que potencializam a síntese de TGF $\beta$ , importante fator supressor tumoral.

Como se reconhece a influência do tabagismo sobre o nível de MEO, procurou-se correlacioná-los, no entanto, não foi possível estabelecer relação estatística significativa. Contribuindo para tal resultado, o pequeno tamanho amostral de fumantes, o qual dificulta a percepção dos efeitos. Isso porque estatísticas extraídas de amostras pequenas tendem a ser não representativas dos parâmetros populacionais.

Neste ponto da discussão, buscamos avaliar o estado nutricional da amostra, uma vez que é um recurso terapêutico a ser instituído em um paciente com câncer, pois pode refletir na tolerância ao tratamento, na qualidade de vida, na morbimortalidade. O paciente com câncer pode apresentar aumento de mediadores inflamatórios, como as citocinas. Essa situação pode fazer com que ocorra diminuição da massa celular corporal, mas, também, expansão do líquido extracelular. Assim, o peso corpóreo e, conseqüentemente, o IMC podem estar

normais, apesar da diminuição da massa celular corporal devido ao hipermetabolismo e ao aumento da degradação proteica, ocasionando retenção hídrica e mascarando o real estado nutricional <sup>(177)</sup>.

Ainda quanto ao estado nutricional, é importante considerar as mínimas repercussões nas capacidades digestiva e absorptiva, apetite ou saciedade, decorrentes do CPNM, e ainda sintomas como fadiga, náuseas, vômitos, disgeusia ou dor, não são frequentes no quadro clínico de portadores de CPNM.

Não houve diferença estatística significativa dos parâmetros antropométricos entre os grupos caso e controle, conforme Tabela 5, e entre os grupos placebo e suplementado, somente houve diferença estatística na altura, conforme Tabela 13, permitindo constatar um perfil homogêneo dos grupos. Os valores médios de IMC e PCT sugerem sobrepeso e acúmulo de massa adiposa respectivamente tanto no grupo controle quanto no grupo caso, e os valores médios dos índices nutricionais CB e CMB sugerem normalidade quanto à concentração de massa magra e adiposa dos grupos.

A presença de eutrofia em 51,7% e sobrepeso/ obesidade em 48,3% pelo IMC no grupo caso (Tabela 6) sinalizaram para o baixo impacto nutricional provocado pelo CPNM, vez que apresenta elevado índice de cura e efetivo tratamento com a remoção da lesão cutânea.

É oportuno enfatizar que a avaliação do estado nutricional pelo IMC entre os grupos caso e controle alcançou diferença estatística significativa ( $p=0,0002$ ), com maior frequência de excesso de peso no grupo controle, pois apesar do CPNM não acarretar transtornos digestivos e absorptivos que comprometam o estado nutricional de seus portadores, é natural que a ausência de um evento patológico repercute favoravelmente nas condições psíquicas e emocionais, proporcionando bem estar, melhor apetite e maior liberdade na seleção de alimentos, que pode levar ao aumento do peso corporal.

Quanto aos grupos placebo e suplementado, não foi encontrada diferença significativa ( $P=0,4215$ ), demonstrando a homogeneidade do grupo caso, conforme Tabela 14.

Alinhando-se aos resultados atuais, Tartari *et al.* <sup>(178,179)</sup>, Gómez-Candela *et al.* <sup>(180)</sup>, Zorlini *et al.* <sup>(181)</sup>, Azevedo e Bosco <sup>(182)</sup> e Caro *et al.* <sup>(183)</sup>, que avaliaram o estado nutricional de pacientes com câncer pelo IMC e encontraram elevados índices de eutrofia e/ou sobrepeso.

O IMC médio dos sujeitos que integravam o grupo caso não esteve de acordo com as recomendações oficiais contidas no relatório de perspectiva global sobre alimentos, nutrição e prevenção do câncer, uma vez que o IMC adequado para prevenção de câncer deve manter-se entre 18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup>, com mediana indicada de 21 a 23 kg/m<sup>2</sup> <sup>(184)</sup>, podendo constituir-se em fator que poderia contribuir para a geração de estresse oxidativo.

A idade seria um dos fatores que poderiam explicar o excesso de peso e de massa adiposa e magra evidenciados. A média de idade do grupo placebo foi de 65,59 + 13,18 anos e de 58,96 + 14,9 anos a do grupo suplementado, fase em que as mudanças fisiológicas decorrentes do envelhecimento podem interferir no estado nutricional, sendo elas: diminuição do metabolismo basal, redistribuição da massa corporal, alterações no funcionamento digestivo, alterações na percepção sensorial e diminuição da sensibilidade à sede <sup>(185)</sup>. Assim, o excesso de peso entre os sujeitos pode encontrar suporte nessas mudanças fisiológicas, associando-se ainda às mínimas alterações nas capacidades digestivas e absorptivas, no apetite e na acuidade do paladar secundárias a patologia em foco.

O sobrepeso e obesidade também encontram amparo em um balanço energético positivo, associado ao sedentarismo. Quanto o aporte calórico excede o gasto energético, maior acumulação de tecido adiposo e maior peso. Quanto maior o aporte energético, mais intenso será o metabolismo energético, o qual gera moléculas reativas de oxigênio potencialmente danosas às estruturas celulares.

À medida que a idade avança deve-se manter o peso corporal o mais próximo possível do peso ideal para diminuir os riscos de desenvolver doenças crônicas, pois segundo Farinatti <sup>(186)</sup> a menor ingestão calórica tende a atenuar o processo de dano celular à medida que se envelhece, com redução de peroxidação lipídica, menor acúmulo de proteínas oxidadas e danificação oxidativa do DNA.

Tendo em vista as limitações do indicador IMC para avaliação do estado nutricional, foram realizadas as medidas de circunferências e prega cutânea, a fim de permitir uma avaliação mais específica da adiposidade e da distribuição da gordura corporal. A avaliação do estado nutricional pelos índices PCT, CB e CMB não diferiu estatisticamente entre os grupos controle, placebo e suplementado.

Os resultados mostraram maior frequência de excesso de massa adiposa pelo PCT, e de excesso de massa magra e adiposa pelos índices CB e CMB nos grupos placebo e suplementado analisados em conjunto, mas também foi detectada depleção nutricional no grupo controle, placebo e suplementado por estes parâmetros, distanciando-se da avaliação nutricional pelo IMC, que não detectou a presença de desnutrição nos grupos, ratificando que a avaliação nutricional por estes índices tem mais especificidade para dimensionar o déficit nutricional quando comparado ao IMC, confirmando as limitações desse último parâmetro. Os resultados do estudo atual opuseram-se aos de Tartari *et al.* <sup>(178)</sup>, Bites *et al.* <sup>(187)</sup> e Miranda *et al.* <sup>(188)</sup>, os quais obtiveram resultados sugestivos de elevadas prevalências de desnutrição pelo PCT e CB nos pacientes oncológicos.

Acumulam-se evidências de que as características qualitativas e quantitativas da dieta são importantes para o estado de saúde, sobretudo no que tange às doenças crônicas, que acometem adultos e idosos preferencialmente.

A frequência de consumo habitual no grupo controle e caso, conforme a tabela 7, apontou para um panorama alimentar incompatível à prevenção do CPNM, com consumo insuficiente de alimentos fontes de nutrientes antioxidantes para atender as elevadas demandas antioxidativas, requeridas para frear o

estresse oxidativo, haja vista o consenso na literatura sobre os efeitos removedores de radicais livres exercidos por tais nutrientes, atuando, em conjunto com medidas comportamentais para a proteção aos danos oxidativos. O consumo habitual de laranja, mamão, abóbora e feijão mostrou-se insuficiente em ambos os grupos, sem diferença estatística.

Corroborando com os resultados atuais quanto ao consumo insuficiente de frutas, verduras e leguminosas, a Pesquisa de Orçamentos Familiares-Inquérito de nutrição e alimentação (INA) <sup>(190)</sup> concluiu que a região Nordeste figura como exemplo de consumo aquém do ideal com relação a verduras e legumes, corroborando com os resultados atuais. Ressaltando ainda que a participação conjunta destes alimentos na população brasileira esteve bastante aquém das recomendações de 9%-12% das calorias totais, meio urbano era de 3,2% das calorias totais e no meio rural era de 1,8% das calorias totais. O relatório ainda constatou a participação relativa em relação as calorias totais de: feijão e outras leguminosas de 7,4%, sucos e frutas naturais de 1,9%, verduras e legumes de 0,7%, carnes de 12%, e cereais e derivados de 37,2%<sup>(190)</sup>.

É importante destacar que alimentos como feijão, abóbora, laranja, mamão ricos em vitaminas A, C e flavonóides, que agem como sequestrantes de radicais livres, deveriam ter seu consumo estimulado e adequado quantitativamente para exercer tais efeitos. Associado as frequências irregulares do consumo habitual desses alimentos constatadas no estudo ora apresentado, a quantidade consumida estava abaixo da porção diária ideal, sugerida por Philips *et al.* <sup>(191)</sup>, retratando o déficit quantitativo da alimentação. E ainda não houve relato de consumo regular de cereais integrais, sementes, grãos, verduras.

Dados semelhantes foram observados nos estudos de Malta *et al.* <sup>(192)</sup>, Toral *et al.* <sup>(193)</sup>, Azevedo e Bosco <sup>(182)</sup>, Carvalho e Rocha <sup>(194)</sup>, Panziera *et al.* <sup>(195)</sup>, Figueredo *et al.* <sup>(196)</sup>, Martins *et al.* <sup>(197)</sup>, Viebig *et al.* <sup>(198)</sup>, permitindo inferir o risco de deficiência de micronutrientes e fibras, privando os sujeitos dos efeitos benéficos representados por esses nutrientes na prevenção de câncer. Sobre

esse aspecto deve-se enfatizar que a insuficiência no aporte desses alimentos constitui-se entre os dez principais fatores de risco para a carga total global de doença em todo o mundo <sup>(184)</sup>. Os incontestáveis benefícios para a saúde associados ao consumo de frutas, verduras e leguminosas devem-se, em parte, à presença de antioxidantes nestes alimentos <sup>(18)</sup>.

Amparando os resultados atuais, o Guia alimentar para a população brasileira (2005) <sup>(199)</sup> concluiu que a participação de frutas, legumes e verduras no valor energético total fornecido pela alimentação das famílias brasileiras, independentemente da faixa de renda, é baixa, variando de 3% a 4%, entre 1974-2003 <sup>(202)</sup>. Destaca-se por oportuno que consumo mínimo recomendado de frutas, legumes e verduras é de 400 gramas/dia para garantir 9% a 12% da energia diária consumida, considerando uma dieta de 2.000 kcal. Isso significa aumentar em pelo menos 3 vezes o consumo médio atual da população brasileira <sup>(199)</sup>.

Nesta discussão, é válido mencionar que Bressan *et al.* <sup>(64)</sup> reforçam os benefícios de um consumo regular de uma dieta enriquecida em frutas e leguminosas na atenuação das concentrações de malondialdeído (MDA), PCR, estresse oxidativo e pró-inflamatório <sup>(64)</sup>. No mesmo sentido, Thompson *et al.* <sup>(200)</sup> constataram redução de 20% na excreção urinária de F2-isoprostano (P=0,01) nos indivíduos com dieta rica em frutas e leguminosas e estudo de Nanri *et al.* <sup>(201)</sup> verificou que um alto consumo de frutas e hortaliças, produtos de soja e peixe mostrou-se inversamente associado às concentrações plasmáticas de PCR <sup>(64,201)</sup>.

O déficit na ingestão de zinco tem sido associado à ingestão elevada de alimentos ricos em carboidratos, com pequena contribuição de proteína animal, um perfil comum entre idosos devido à menor renda e restrições para obter e preparar as refeições <sup>(197)</sup>. Os achados deste estudo sugerem provável déficit de zinco no grupo caso, sendo este identificado por um consumo irregular e insuficiente de fontes proteicas, representado pelos alimentos: carne bovina, peixes e ovos e ainda, ausência de relato de consumo de grãos integrais, cereais

integrais, castanhas nozes, amêndoas, germen de trigo, castanhas, pistaches, fígado e outros alimentos ricos neste nutriente.

Este trabalho mostrou um consumo escasso (até 1 vez /semana) de fontes de licopeno, citando-se o tomate em 20% e o mamão em 60% do grupo caso, as demais fontes de licopeno, não foram sequer citadas pelos sujeitos, como: goiaba, melancia e pitanga, sendo forçoso concluir pela inadequação de sua proteção antioxidante, que recai sobre lipídios, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), proteínas e DNA. E também mostrou provável déficit de vitaminas C, A e E, sendo este identificado por um consumo irregular e até esporádico de alimentos como: suco de laranja, caju, acerola, abóbora, laranja, mamão, melão, manga, morango, fígado, óleo de fígado de bacalhau, cenoura, óleo de girassol, de amêndoas, óleos vegetais, sementes, amêndoas e outros, concluindo-se que uma parte da amostra privava-se dos efeitos antioxidantes exercidos pelos nutrientes presentes nestes alimentos.

As frutas e verduras têm baixa densidade energética, o que favoreceria a manutenção saudável do peso corporal, portanto são alimentos extremamente adequados, frente ao excesso de peso detectado na amostra.

Na opinião de Verde <sup>(201)</sup> as frutas e verduras têm assumido posição de destaque nos estudos que envolvem a prevenção de câncer. De acordo com World Center Research Fund, American Institute for Cancer Research <sup>(184)</sup>, o aumento da ingestão de frutas, hortaliças sem amido, grãos não refinados e leguminosas contribui para a prevenção de diversos tipos de câncer, reforçando os seus efeitos benéficos pelo aporte de vitamina C e marcado potencial antioxidante.

Nesta perspectiva, Sousa *et al.* <sup>(202)</sup> reafirmam a importância de políticas de alimentação e nutrição, que envolvam o estímulo ao consumo de alimentos saudáveis, como frutas, verduras e grãos integrais, e a manutenção do consumo de alimentos básicos tradicionais, como o arroz e o feijão; e, ao mesmo tempo,

que incentivem a redução do consumo de alimentos processados ricos em sódio, gordura saturada e açúcar.

As concentrações dietéticas médias ajustadas pela energia de nutrientes antioxidantes no grupo controle (Tabela 8) apontaram para grande probabilidade de adequação de selênio, cobre e zinco, uma vez que os valores médios desses nutrientes se encontravam superiores aos valores da EAR. Apresentando consumo alimentar superior de cobre e zinco com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) e também superior de vitamina C, sem diferença significativa em relação ao grupo caso.

Tal quadro conduz a uma proteção antioxidante do grupo controle e acentuada vulnerabilidade aos danos oxidativos no grupo caso. Ressalta-se, por oportuno, que o grupo caso apresenta mais expressiva exposição solar, idade mais avançada, o que acentua tal vulnerabilidade. E ainda o evento progresso de CPNM revela-se apto a contribuir para um marcante estresse oxidativo crônico, com produção crônica de radicais livres.

O grupo caso, distribuídos entre o grupo suplementado e placebo, apresentou um padrão de consumo alimentar de nutrientes antioxidantes com grande probabilidade de inadequação, uma vez que os valores médios desses nutrientes ajustados pela energia se encontravam inferiores a EAR, exceto quanto aos valores médios de ingestão de selênio (Tabela 15). E ainda a classificação do padrão de consumo alimentar relativo aos nutrientes antioxidantes permitiu constatar predominância de déficit quantitativo de consumo de todos os nutrientes avaliados, tanto no grupo suplementado quanto no grupo placebo, revelando-se propício à instalação de quadros carenciais, inabilitando o organismo de usufruir dos efeitos antioxidantes desempenhados por esses nutrientes.

Esses resultados podem ser explicados pela irregular ingestão de fontes de vitaminas A, C e E e ainda do mineral zinco, uma vez que se identifica essa irregularidade pelo baixo consumo de fígado, vegetais verdes escuros, abóbora, cenoura, frutas cítricas, cereais integrais, castanhas, amêndoas, e outros com elevado teor desses nutrientes. O consumo irregular desses nutrientes pode ser



explicado pelos hábitos alimentares dos idosos, faixa etária predominante neste estudo, os quais apresentam dificuldade de mastigação e deglutição, dificuldade de acesso a alimentos naturais ou de preparações mais saudáveis, estados de comorbidades associados, uso crônico de medicações, entre outros.

A relação entre nutrientes antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo do grupo controle (Tabela 9) mostrou correlação negativa e fraca entre CAOT e vitamina A e nitrito e vitamina E, sugerindo que a ingestão dietética desses nutrientes poderia induzir um mecanismo compensatório ao estresse oxidativo, freando a produção de radicais livres e retardando a exaustão das defesas antioxidantes, contribuindo para menores concentrações séricas de marcadores de estresse oxidativo nesse grupo. Já no grupo caso (Tabela 10), houve associação negativa e fraca entre TBARS e vitamina A, pondo em evidência a influência do consumo de alimentos fontes de vitamina A na redução de estresse oxidativo, vez que o nutriente em foco comporta-se como importante antioxidante, atuando como varredor de RL, livrando o organismo dos efeitos negativos destes sobre o equilíbrio redox da pele.

A alimentação correta, equilibrada e rica em nutrientes antioxidantes atua como mecanismo preventivo na geração de RL, daí pode-se inferir que os sujeitos que tiveram CPNM, inseridos neste estudo, não adotavam estratégias preventivas aptas a proteger a pele, o que associado ao peso excessivo, a excessiva exposição ao sol, a idade avançada explicaria o perfil pró-oxidante e consequentemente maior vulnerabilidade a doença.

Dados semelhantes ao nosso estudo foram encontrados no INA <sup>(190)</sup>, o qual referiu que a inadequação nutricional relativa aos nutrientes antioxidantes no sexo feminino na faixa etária superior a 60 anos foi de 53% quanto à vitamina C, 100% quanto a vitamina E, 80,6% quanto a vitamina A, 38,4% quanto ao mineral zinco, 11,2% quanto ao mineral selênio e 20,1% quanto ao mineral cobre e; no sexo masculino na mesma faixa etária foi de 51,4% quanto à vitamina C, 99,9% quanto a vitamina E, 79,1% quanto a vitamina A, 24,4% quanto ao mineral zinco, 6,3% quanto ao mineral selênio e 12,5% quanto ao mineral cobre.

E ainda outros estudos apresentaram resultados que se compatibilizaram com nosso estudo, como: Firme e Gallon <sup>(204)</sup> referindo-se a pacientes portadores de câncer de células escamosas do esôfago, constataram consumo insuficiente de nutrientes antioxidantes e ainda pesquisas conduzidas por Silva *et al.* <sup>(205)</sup>, Rohenkohl *et al.* <sup>(51)</sup>, Panziera *et al.* <sup>(195)</sup>, Fernandes *et al.* <sup>(206)</sup>, Lopes *et al.* <sup>(207)</sup>; Leão e Santos <sup>(208)</sup> as quais reiteravam a probabilidade de inadequação desses nutrientes.

Dados semelhantes ao estudo atual quanto ao consumo deficiente de vitamina E, e vitamina A foram encontrados por Fuchs-Tarlovsky *et al.* <sup>(209)</sup> em pacientes com câncer de colo uterino. Por outro lado, Tartari *et al.* <sup>(178)</sup> encontraram que a ingestão de vitamina C mostrou-se adequada, tanto para o sexo feminino quanto para o masculino, o que diferiu de dados encontrados neste estudo, os quais mostram grande probabilidade de inadequação no consumo de Vitamina C tanto no grupo placebo quanto no grupo suplementado.

Ressalta-se que estes sujeitos poderiam ser beneficiados com a suplementação de nutrientes antioxidantes, pois as baixas ingestões dietéticas constatadas poderiam induzir uma amplificação dos efeitos antioxidantes nos nutrientes suplementados, no entanto, os resultados mostraram efeitos discretos na atenuação do estresse oxidativo após suplementação, manifestados pela tendência de redução dos marcadores TBARS, CAOT e isoprostano, mas ainda mantendo o perfil pró-oxidativo, com as concentrações de isoprostano ainda superiores as do grupo controle. O consumo de álcool em 15% dos casos e tabagismo referido por 13,3% dos casos, o tempo de suplementação de apenas 60 dias, as doses de antioxidantes podem ter contribuído para os discretos efeitos observados no estudo atual.

A probabilidade de inadequação dos nutrientes em foco, mesmo não atuando isoladamente na propensão ao câncer de pele, pode contribuir para a exaustão dos mecanismos endógenos antioxidantes, gerando um desequilíbrio oxidante / antioxidante, que pode conduzir ao estresse oxidativo. Em persistindo o

atual consumo alimentar, acarretará nítido comprometimento nutricional, inabilitando, assim, o organismo a suprir as demandas antioxidativas, agora aumentadas, devido ao CPNM previamente diagnosticado. É muito provável que isto concorra para delinear um quadro de vulnerabilidade na população ora analisada.

Em face da ação desses nutrientes na prevenção do estresse oxidativo e do estresse inflamatório, torna-se imperiosa a adoção de hábitos alimentares que assegurem a ingestão adequada de alimentos fontes destes nutrientes, como estratégia preventiva aos danos oxidativos na população estudada.

Tendo em vista as características da população estudada, o estudo em foco verificou a presença de determinados fatores constitucionais, comportamentais e bioquímicos que pudessem precipitar o desenvolvimento de CPNM.

A compreensão dos fatores de risco epidemiológicos para o câncer da pele procede principalmente de estudos conduzidos no exterior: Austrália, América do Norte e Europa <sup>(24)</sup>. A incidência deste câncer difere entre regiões do Brasil, devido à heterogeneidade cultural e aspectos sociodemográficos que podem levar à exposição a diferentes fatores de risco, não há dados conclusivos referentes aos fatores de risco para este câncer no Brasil, justificando-se assim a realização desse tipo de investigação em nosso meio.

Em função do crescimento da incidência, morbidade e mortalidade secundária aos diversos tipos de câncer em nosso meio, a busca de novos formatos de diagnóstico e fatores de risco vem despertando muito interesse perante a comunidade científica, e o uso de biomarcadores representa uma alternativa.

Na perspectiva de um melhor entendimento sobre a relação entre estresse oxidativo e câncer, alguns estudos têm utilizado a quantificação dos MEOs para determinação de risco de alguns tipos de câncer. Sobre este aspecto, ressalta-se que o uso de marcadores de estresse oxidativo se reveste de utilidade diagnóstica e preventiva, na medida em que possibilitam a identificação precoce de sujeitos de

risco, no entanto, é necessário reconhecer que a utilização desses marcadores para diagnóstico de doenças é difícil, devido aos problemas analíticos de especificidade e sensibilidade <sup>(210)</sup>.

No presente estudo, pela análise de regressão logística multivariada, o F2 isoprostano foi associado ao risco de CPNM (OR 1,044; p=0,0099), após ajuste para tempo de exposição solar, constatando-se que a cada aumento de uma unidade na medida deste marcador aumenta em 4% a chance de câncer.

Nesse sentido, ressalva-se que, dentre os marcadores de peroxidação lipídica, o isoprostano é o mais sensível, mas também muito difícil de medir <sup>(210)</sup>, suas concentrações nos tecidos e fluidos biológicos proporciona uma nova abordagem para a quantificação de estresse oxidativo, bem como uma base bioquímica para avaliar a intervenção terapêutica, revelando-se um índice altamente preciso e exato do estresse oxidativo <sup>(86,87,89)</sup>. Há estudos que sugerem que o F2 isoprostano deva ser considerado não apenas mero marcador, mas "mediador" fisiopatológico da doença, vez que pode mediar muitas características das doenças, para as quais são usados como marcadores <sup>(86,87,210)</sup>. Na visão de Montuschi *et al.* <sup>(86)</sup>, o F2-isoprostano é um importante marcador do *status* pró-oxidante, envolvido na patogenia de diferentes doenças e na resposta à exposição às substâncias tóxicas <sup>(86)</sup>.

Os resultados agora apresentados estão compatíveis com Barocas *et al.* <sup>(150)</sup>, que relataram elevação nas concentrações de isoprostano em indivíduos com câncer de próstata e ainda Rossner *et al.* <sup>(211)</sup> evidenciaram resultados sugestivos do isoprostano como fator associado ao risco de câncer de mama, no entanto reforçam que tal associação está influenciada pelo tabagismo. Ainda compatível com Qi Dai e Zhu Xiangzhu <sup>(157)</sup>, que descobriram associação entre F2 isoprostano e 15-F2 isoprostano com o câncer de mama em mulheres obesas, com Epplein *et al.* <sup>(212)</sup> que apoiam a associação da excreção urinária de 15-F2 isoprostano como um marcador de risco de câncer de pulmão e ainda com

Cai *et al.* <sup>(213)</sup>, que relatam que níveis urinários de 8 F2 isoprostano estão elevados em modelos animais com colite, leão pré-cancerosa de câncer col retal.

Na perspectiva do isoprostano como “mediador” fisiopatológico de determinadas doenças, há estudos que associam concentrações elevadas de isoprostano à hipercolesterolemia, diabetes melitus, obesidade, hiperinsulinemia, doença renal, asma, falência respiratória aguda, fibrose cística, sarcoidose pulmonar e aterosclerose <sup>(158, 210)</sup> e ainda novos estudos são requeridos para determinar se o F2 isoprostano pode ser usado no prognóstico de doenças cardiovasculares ou na individualização de estratégias terapêuticas <sup>(158)</sup>. A utilização do isoprostano como mediador de doenças decorre do fato de que os produtos do seu metabolismo apresentam relação com ações biológicas envolvidas no quadro fisiopatológico das mesmas.

Percebe-se, portanto, que muitas doenças apresentam as concentrações séricas ou níveis urinários de isoprostano elevados, sugerindo a associação deste como marcador de risco ou indicando a presença da doença.

Os resultados atuais sugerem o uso do isoprostano como marcador de risco para CPNM. Estudos focalizando este marcador de peroxidação lipídica em portadores de CPNM mostram elevação nas suas concentrações na pele <sup>(140)</sup>; no entanto, não há estudos evidenciando o papel do F2 isoprostano como marcador de risco para CPNM. Daí o caráter inovador do estudo agora apresentado, possibilitando a utilização do isoprostano para o diagnóstico precoce do câncer em questão, permitindo a adoção de estratégias preventivas para impedir ou retardar a instalação do CPNM. E ainda o mesmo marcador reveste-se de utilidade na investigação da eficácia da terapia antioxidante na prevenção e controle das complicações decorrentes de patologias, cujos mecanismos fisiopatológicos envolvam estresse oxidativo, como foi possível constatar uma tendência de redução nas concentrações plasmáticas de F2 isoprostano após a suplementação de antioxidantes realizada neste estudo.

Os resultados mostraram, ainda, que a cada ano a mais para o fator idade aumenta em 12% a chance de câncer, sugerindo a idade com fator de risco para CPNM, pela análise de regressão logística multivariada, (OR 1,121; p=0,005), após ajuste para tempo de exposição solar.

Estudos conduzidos por Spindola *et al.*<sup>(129)</sup> e Ferreira *et al.*<sup>(24)</sup> descobriram que a incidência desde câncer aumenta a partir da sexta década. E ainda Rocha *et al.*<sup>(130)</sup> concluem que o risco para lesões cutâneas pré-malignas e malignas foi diretamente proporcional à idade, sendo que, aos 80 anos ou mais de idade, a probabilidade de adquirir a doença passou a ser cerca de seis vezes maior do que na faixa etária dos 50 a 59 anos.

A associação direta da idade com o CPNM encontrou suporte em Chinem e Miot<sup>(136)</sup>, Qureshi *et al.*<sup>(214)</sup>, além de Madan *et al.*<sup>(215)</sup>, estes enfatizam que a incidência do CPNM aumenta com a idade e 80% dos casos concentram-se na faixa etária superior a 60 anos.

Esse resultado pode ser explicado em função de que o aumento da idade favorece a maior produção de RL, assim como exaustão dos mecanismos de defesa antioxidante, contribuindo para a instalação do estresse oxidativo e, ainda há de se considerar o efeito cumulativo das RUV ao longo dos anos, contribuindo para um estresse oxidativo crônico com elevação crônica de RL. Associado a isso, com o avanço da idade ocorre depressão do sistema imune cutâneo, com ineficiência do sistema de reparo do DNA, contribuindo para o desenvolvimento do CPNM

Pela análise de regressão logística univariada, a presença de antecedentes para câncer foi associada ao risco de CPNM (OR 11,667; p<0,0001), no que se compatibilizou com estudos conduzidos por Popim *et al.*<sup>(20)</sup> e Ferreira *et al.*<sup>(24)</sup>, os quais destacam a história de câncer na família como importante fator de risco. Por outro lado, Maia *et al.*<sup>(4)</sup> não constataram a história familiar de câncer de pele como fator de risco, quando tal variável foi submetida à regressão logística condicional múltipla análise, com um odds ratio de 1,25.

O resultado do nosso estudo pode ser explicado em função de que a história familiar constitui-se em importante aspecto na patogênese do câncer cutâneo, em função do fator genético, propriamente dito, que condiciona o aparecimento de mutações gênicas aptas a contribuir para o desenvolvimento deste câncer e ainda pela influência do fator ambiental que expõe os membros de uma mesma família aos mesmos estímulos.

O estudo mostrou ainda, pela análise univariada, que as concentrações de CAOT associaram-se ao CPNM (OR1,772; p=0,0449). Tais resultados decorrem do aumento nas suas concentrações nos pacientes que tiveram CPNM, cuja explicação está amparada em um possível mecanismo compensatório do sistema de defesa antioxidante, acionado quando a produção de ERO e ERN aumenta. Esses resultados estão compatíveis com Rajneesh *et al.* <sup>(153)</sup> e Yeh *et al.* <sup>(142)</sup> que constataram aumento significativo do *status* antioxidante em pacientes com câncer de mama. Por outro lado, reduzidas concentrações de CAOT associam-se a diversas condições patológicas como: diabetes mellitus, hipertensão arterial, síndrome metabólica, hipercolesterolemia <sup>(91)</sup>.

Sobre esse marcador, é oportuno esclarecer que sua avaliação em diferentes situações metabólicas e patológicas é de grande interesse clínico e nutricional, revelando-se uma abordagem útil para determinar os grupos de risco para desenvolver determinadas doenças, na medida em que este parâmetro pode ser considerado biomarcador de estresse oxidativo <sup>(91)</sup>; e assim como a avaliação do isoprostano, também se reveste de utilidade para avaliar a eficácia da terapia antioxidante na prevenção e/ou controle de patologias <sup>(216)</sup>, cujos mecanismos fisiopatológicos envolvam estresse oxidativo, podendo-se verificar, no nosso estudo, uma tendência de redução nas concentrações plasmáticas de CAOT após a suplementação.

Neste estudo, a cor da pele não foi associada ao CPNM, no que discordou dos resultados de Popim *et al.* <sup>(20)</sup> e Rocha *et al.* <sup>(130)</sup>, os quais relatam que a cor da pele é um fator importante em relação ao câncer de pele, vez que a pele

branca apresenta menor proteção em relação à RUV, principalmente à RUVB, de forma que indivíduos com pele branca configuram-se como grupo de risco para esse tipo de neoplasia. Como já foi visto nesta discussão, há de se considerar a heterogeneidade geográfica e diferentes aspectos sociodemográficos responsáveis por diferentes características nos portadores de CPNM, explicando-se assim a cor de pele parda ser a mais prevalente neste estudo.

E ainda, o fumo e álcool não foram associados ao CPNM no nosso estudo, assemelhando-se aos resultados de Rocha *et al.* <sup>(130)</sup> e Chinem e Miot <sup>(136)</sup>. O tamanho amostral pode ter contribuído para a não percepção da influência desses fatores no nosso estudo.

Portanto, nosso estudo destaca a possibilidade da utilização de um marcador de estresse oxidativo, o isoprostano, como um biomarcador e seu aumento está relacionado ao aparecimento do câncer de pele.



## 7. CONCLUSÃO





Este estudo sugere que pessoas previamente diagnosticadas com CPNM já submetidas a tratamento cirúrgico apresentaram elevado estresse oxidativo em relação às pessoas saudáveis quanto a este aspecto. O isoprostano revelou-se o mais sensível marcador de peroxidação lipídica a detectar elevação do estresse oxidativo dos casos em relação aos controles. A suplementação de antioxidantes (Vitaminas C, E e mineral Zinco) não reduziu significativamente os parâmetros de estresse oxidativo. Sugere que o marcador de estresse oxidativo F2-isoprostano e a idade podem ser utilizados como fatores de risco para o desenvolvimento de CPNM. A cobertura nutricional de nutrientes antioxidantes não foi alcançada, com grande probabilidade de inadequação do consumo desses nutrientes, acarretando um nítido comprometimento dos mecanismos de defesa antioxidante. Recomenda-se a adoção de medidas preventivas para amenizar a produção desenfreada de radicais livres, englobando hábitos alimentares e estilo de vida saudáveis.



## **8. REFERÊNCIAS**





1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 126p
2. Ministério da Saúde. Brasil. Secretaria de Atenção à Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância. A situação do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2006.120p
3. Sampaio SAP, Rivitti EA. Dermatologia. 3<sup>a</sup> ed. ampl. São Paulo: Artes Médicas, 2007.
4. Maia M, Proença NG, Moraes JC. Risk factors for basal cell carcinoma: a case- control study. Rev. Saúde Pública 1995; 29(1): 27-37.
5. Bariani RL, Nahas FX, Barbosa MVJ, Farah AB, Ferreira LM. Basal cell carcinoma: an updated epidemiological and therapeutically profile of an urban population. Acta Cirúrgica Brasileira 2006; 21(2).
6. Chinem VP, Miot HA. Epidemiologia do Carcinoma Basocelular. An. Bras. Dermatol. Rio de Janeiro 2011; 86(2): 292-305.
7. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Brasil. Programa Nacional de Combate ao Câncer de Pele. Campanha Nacional de Prevenção do câncer de pele. 2011
8. Narendhirakannan RT, Hannah MAC. Oxidative stress and skin cancer: an overview. Ind J Clin Biochem 2013; (apr-june) 28(2) :110-115.
9. Kruk J, Duchnik E. Oxidative stress and skin diseases: Possible role of physical activity. Asian Pac J Cancer Prev.2014; 15 (2):561-568
10. Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T. UV-induced skin damage. Toxicol 2003; 189: 21-39.

11. Nishigori C, Hattori C, Toyokuni S. Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxid. Redox signaling* 2004 Jun; 6(3):561-70.
12. Trouba K J, Hamadeh HK, Amin RP, Germolec DR. Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid. Redox signaling* 2002; 4(2):665-673.
13. Halliwell B, Gutteridge J M C. *Free radicas in biology and medicine*. Clarendon press. Oxford. 2<sup>a</sup> ed. 1993.
14. Poljsak B, Dahmane R. Free Radicals and Extrinsic Skin Aging. *Dermatol Res and Pract* 2012; 2012:135206. Published on line Feb 29, 2012. doi:10.1155/2012/135206.
15. Hercberg S, Galan P, Preziosi P, Bertrais S, Mennen L, Malvy D, Roussel AM, Favier A, Briancon S. The SU.VI.MAX study: a randomised, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med* 2004; 164: 2335–42.
16. Burns EM, Tober KL, Riggenschach JA, Kusewitt DF, Young GS *et al.* Differential Effects of Topical Vitamin E and C E Ferulic® Treatments on Ultraviolet Light B-Induced Cutaneous Tumor Development in Skh-1 Mice. *PLoS ONE* 2013; 8(5): e63809. doi:10.1371/journal.pone.0063809
17. Barreiros ALBS, David JM, David DJP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. *Quim Nova* 2006; 29: 113-123.
18. Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim. Nova* 2007; 30(2): 441-449.
19. *Ecologia Médica*. Antioxidantes e local de ação. [Acesso em 14 janeiro.2014] Disponível em URL: [www.ecologiamedica.net/2010/11](http://www.ecologiamedica.net/2010/11).



20. Popim RC, Corrente JE, Marino JAG, Sousa CA. Câncer de pele: uso de medidas preventivas e perfil demográfico de um grupo de risco na cidade de Botucatu. *Ciênc. Saúde colet.* 2008; 13(4):1331-36.
21. Sousa SRP, Fischerb FM, Sousa JMP. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: revisão da literatura. *Rev. Saúde Públ* 2004; 38(4):588-98
22. Cotter MA, Thomas J, Cassidy P, Robinette K, Jenkins N, Florell SR, Leachman S, Samlowski WE, Grossman D. Acetylcysteine Protects Melanocytes against Oxidative Stress/Damage and Delays Onset of Ultraviolet-Induced Melanoma in Mice. *Clin. Cancer Res* 2007; 13(19): 5952-8.
23. Martinez MAR, Francisco G, Cabral LS, Ruiz IRG, Festa Neto C. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. *An. Bras Dermatol* 2006; 81(5):405-419
24. Ferreira F.R, Nascimento LFC, Rotta O. Fatores de risco para câncer da pele não melanoma em Taubaté, SP: um estudo caso-controle. *Rev Assoc Med Bras* 2011; 57(4):431-437.
25. Suehara LY, Simone K, Maia M. Avaliação do envelhecimento facial relacionado ao tabagismo. *An Bras Dermatol* 2006; 81(1):34-9.
26. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev Nut* 1996, 16:33-50
27. Abdalla DSP. Estresse oxidativo e alimentação. In: Tirapegui J. *Nutrição: Fundamentos e aspectos atuais.* 2<sup>a</sup> ed. São Paulo. Editora Atheneu, 2006. P.181 -203.
28. Halliwell B, Cross C E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ health Perspect* 1994, 102(10):5-12.

29. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* June 2006; 141: 312-322.
30. Gutteridge JMC, Halliwell B. *Antioxidants in nutrition, health, and disease.* 2<sup>a</sup> ed. Oxford University Press 1996.
31. Valko CJ, Rhodes J, Moncol M, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160: 1-40.
32. Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ.,Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vina-Ribes J. Functional food science and defense against reactive oxidative species. *Br J Nutr*1998; 80:77-112.
33. McCord J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J med* 2000; 108: 652-659
34. Nogués M R, Giralt M, Cervelló I, Castillo D D, Espeso O, Argany N, Aliaga A, Mallol J. Parameters related to oxygen free radical in human Skin: a study comparing healthy epidermis and skin cancer. *J invest dermatol* 2002; 119 (3):645-52.
35. Ribeiro SMR, Queiroz JH de, Pelúzio MCG, Costa NMB, Matta SLP, Queiroz MELR. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Biosci J* 2005; 21(3): 133-149.
36. Cerqueira NF, Yoshida WB. Nitric oxide: review. *Acta Cir Bras* [serial online] 2002 [acesso em 2013 out 12 [Nov-Dec;17(6)]. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.
37. Jordão Jr AA, Vannucchi H. Radicais livres e antioxidantes. A importância da dieta. In: Vannucchi H. *Metabolismo e Nutrição - Nutrição Clínica.* Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2007.P.417-430.

38. Torres LHL. Efeitos da inalação da fumaça do cigarro no estresse oxidativo do sistema nervoso central de camundongos jovens [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2009 [acesso 2013-05-26]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9141/tde-16092009-150022/>
39. Augusto O. Radicais livres: bons, maus e naturais. São Paulo: Oficina de textos; 2006. 120p.
40. Halliwell B. Free radicals and oxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 2012; 70(5):257-265.
41. Guaratini T, Medeiros MHG, Colepicolo P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Quim Nova* 2007; 30(1): 206-213.
42. Barbosa KB, Costa NMB, Alfenas RCG, de Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr* 2010; 23(4):629-643.
43. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Benfato VM, Benfato MS, Kubota LT. Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio, antioxidantes e marcadores do dano oxidativo no sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova* 2007; 30(5):1323-1338.
44. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras* 1997; 43: 61-68.
45. Thomas JA. Estresse oxidativo e defesa contra antioxidantes. In: Shils M. E. *et al.* Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença. 9ª ed. Version 1. São Paulo: Manole; 2003. P.801-811.

46. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2): 231-255. PubMed. PMC;1574951
47. Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr* 1999; 12(2): 123-130.
48. Ronsein GE, Miyamoto S, Bechara E, Di Mascio P. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Quim Nova* 2006; 29(3): 563-568.
49. Jordão JR. A A, Chiarello P G, Bernardes M S M, Vannucchi H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E. *Medicina, Ribeirão Preto.* 1998; 31: 434-449.
50. Borut P. Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2011, Article ID 194586, 15 pages. doi:10.1155/2011/194586
51. Rohendohl CC, Carniel AP, Colpo E. Consumo de antioxidantes durante tratamento quimioterápico. *ABCD, Arq. Bras. Cir. Dig.* [Online]. 2011;24(2); 107-112. ISSN 0102-6720 ABCD
52. Moriel P. Possíveis Conexões entre Hipertensão e Hipercolesterolemia, em Relação a Aterosclerose: Vias de Inativação do Óxido Nítrico e Oxidação das Lipoproteínas. [Tese]. São Paulo (SP): Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas da Universidade de São Paulo; 2001. Disponível em [www.bv.fapesp.br/pt/pesquisa](http://www.bv.fapesp.br/pt/pesquisa)
53. Rover JL, Hoehr NF, Velasco AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado aos métodos eletro analíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim Nova* 2004; 24(1): 112-119.

54. Halliwell, B. 2005. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. eLS. Publicado 2005 mai 3 DOI: 10.1038/npg.els.0003913.
55. Institute of Medicine (IOM). DRIs - Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, selenium and carotenoids. Washington (DC): National Academy Press 2000. P.506.
56. Morato PN, Silva MV. Micronutrientes com função antioxidante e compostos disponíveis nos domicílios das famílias brasileiras. *Nutrire* 2008; 33(1): 43-59.
57. Gagné A, Wei S Q, Fraser W D, Julien P. Absorption, Transport, and Bioavailability of Vitamin E and its Role in Pregnant Women. *J Obstet Gynecol Can* 2008;31(3):210–217
58. Batista ECS, Costa AGV, Pinheiro-Santana HM. Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. *Rev. Nutr* 2007 Campinas 20(5):525-535.
59. Cardoso BR, Cozzolino SMF. Estresse oxidativo na Doença de Alzheimer: o papel das vitaminas C e E. *Nutrire*. 2009; 34(3): 249-259.
60. Cozzolino SMF. Vitamina E. In: Cozzolino SMF. Biodisponibilidade de Nutrientes. 2<sup>a</sup>. ed. Barueri: Manole, 2007. P. 276-292
61. Afolabi AO, Olotu OO, Alagbonsi IA. Vitamins E and C alleviate the germ cell loss and oxidative stress in cryptorchidism when administered separately but not when combined in rats. *ISRN Pharmacol* 2012:843569. doi: 10.5402/2012/843569
62. Manuela-Azulay M, Lacerda CAM, Perez MA, Figueira AL, Cuzzit T. Vitamina C. *An Bras Dermatol* 2003; 78(3):265-72.
63. Fumeron C, Nguyen-Khoat T, Saltiel C, Kebede M, Buisson C, Dru TB, Lacour B, Massy ZA. Effects of oral vitamin C supplementation on oxidative

- stress and inflammation status in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transp* 2005; 20(9): 1874-1879.
64. Bressan J, Hermsdorff HHM, Zulet MA, Martinez JA. Impacto hormonal e inflamatório de diferentes composições dietéticas: ênfase em padrões alimentares e fatores dietéticos específicos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2009; 53(5):572-81.
  65. Huang MC, Chen CC, Peng FC, Tang SH, Chen CH. The correlation between early alcohol withdrawal severity and oxidative stress in patients with alcohol dependence. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009; 33(1): 66-9
  66. Fang YZ; Yang S, Wu G. Free Radicals, Antioxidants and Nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872-879.
  67. Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995; 62(6): 1315-21.
  68. Gomes MM, Saunders C, Accioly E. Papel da vitamina A na prevenção do estresse oxidativo em recém-nascidos. *Rev Bras Saúde Mater-Infant* 2005; 5(3): 275-282.
  69. Murray JC, Burch JA, Iannacchione MA, Pinnell SRA. Topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. *J Am Acad Dermatol* 2008; 59(3):418-25.
  70. Gonzaga IB, Martens A, Cozzolino SMF. Selênio. In: Cozzolino SMF (organizadora). *Biodisponibilidade de nutrientes*. 3<sup>a</sup>ed. atual. e ampl. - Barueri, SP: Manole, 2009.P.644-686
  71. Volp ACP, Bressan J, Hermsdorff HM, Zulet MA, Martinez JA. Efeitos antioxidantes do selênio e seu elo com a inflamação e síndrome metabólica. *Rev. Nutr* 2010;23(4): 581-590.

72. Pedrosa LFC, Cominetti C, Cozzolino SMF. Cobre. In:Cozzolino SMF (organizadora). Biodisponibilidade de nutrientes. 3<sup>a</sup>ed. atual. e ampl. - Barueri, SP: Manole, 2009.P.597-615.
73. Mafra D, Cozzolino SMF. Importância do zinco na nutrição humana. Rev Nutr 2004; 17: 79-87.
74. Fernandes AG, Mafra D. Zinco e câncer: uma revisão. Rev Saúde Com 2005; 1(2): 144-156.
75. Shenkin A. Micronutrients in health and disease. Postgrad Med J. 2006; 82: 559–567. doi: 10.1136/pgmj.2006.047670
76. Prasad AS, Beck F W J, Bao B, Fitzgerald JT, Snell DC, Steinberg JD, Cardozo LJ. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. Am J Clin Nutr. 2007; 85: 837-44.
77. Prasad AS. Zinc: Mechanisms of host defense. J Nutr 2007; 137: 1345–1349.
78. Yuyama LKO, Yonekura L, Aguiar JPL. Zinco. In: Cozzolino SMF (organizadora). Biodisponibilidade de nutrientes. 3<sup>a</sup>ed. atual. e ampl. - Barueri, SP: Manole, 2009.P.616-643.
79. Heidor R, Chagas CEA, Ong TP, Moreno FS. Minerais e Câncer. In: Cozzolino SMF (organizadora). Biodisponibilidade de nutrientes. 3<sup>a</sup>ed. atual. e ampl. - Barueri, SP: Manole, 2009.P.936-979.
80. Bickers DR, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. J Invest Dermatolog 2006;26(12):2565-75.
81. Kraus A, Roth HP, Kirchgessner M. Supplementation with vitamin C, vitamin E or beta-carotene influences osmotic fragility and oxidative damage of erythrocytes of zinc-deficient rats. J Nutri. 1997;127(7):1290-6.

82. Bray T.M. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. *Nutrition* 2000; 16(7-8): 578-581.
83. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, Paula SO, Minin VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: avaliação dos biomarcadores. *Nutrire* 2008; 33(2): 111-128.
84. Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr* 2003; 133: Suppl 3: 933S-940S.
85. Lima E S, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Bras. Ciênc. Farm* 2001; 37(3):293-303.
86. Montuschi P, Barnes P, Roberts SJ. Insights into Oxidative Stress: The Isoprostanes. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14: 703-717.
87. Montuschi, P., Barnes, P. J., Roberts, L J., II. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* 2004;18: 1791–1800.
88. Duarte M., Moresco R.N, de Bem A.F. Metodologias para a determinação da LDL oxidada e sua aplicação como marcador de risco cardiovascular. *Rev. Bras. Anal. Clin* 2008; 40(2): 101-106.
89. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarinib D, Milzani A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin. Chem.* 2006; 52(4): 601–623.
90. Dalle –Donne I, Rossi R, Giustarinib D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin.Chim. Acta.* 2003; 32(9): 23–38.
91. Ferrari CKB. Capacidade antioxidante total (CAOT) em estudos clínicos, experimentais e nutricionais. *J Health Sci Inst* 2010; 28 (4):307-10



92. Ferrari CKB. Total Antioxidant Capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Cel.Mol. Biol* 2008; 7(1):1-15.
93. Rice-Evans, C, Miller N. J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.*1994; 234: 279-93. PubMed. PMID: 7808295.
94. Melo FHM, Malognoni F, Jasiulionis MG. The role of oxidative stress in melanoma development, progression and treatment. Chapter 5.2013 Intech Open Science- Open Minds .<http://dx.doi.org/10.5772/54937>.
95. Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48:1-19.
96. Wittgen HG, Van-Kempen LC. Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. *Melanoma Res* 2007; 17(6):400-9.
97. Svobodova A, Walterova D, Vostalova J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2006 Jul; 150 (1):25–38.
98. Nishigori C. Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem. Photobio. Sci.P* 2006; 5(2):208-14. PubMed. PMID:16465307
99. Yadav AS, Sharma MK.Ultra Violet –B Induced DNA Damage in Human Leucocyte Cells. *Int J Hum Genet* 2008; 8(3): 291-294.
100. Ouhtit A, Ananthaswamy HN. A model for UV-induction of skin cancer J. *Biomed Biotechnol.*2001; 1(1): 5–6.
101. Murtas D, Piras F, Minerba L, Ugalde J, Floris C, Maxia A C, Demurtas P, Perra MT, Sirigu P. Nuclear 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as survival biomarker in patients with cutaneous melanoma. *Oncol Rep* 2010; 23(2):329-35. PMID: 20043092

102. Berhane T, Halliday GM, Cooke B, Barnetson RSC. Inflammation is associated with progression of actinic keratoses to squamous cell carcinomas in humans. *Br.J.Dermatol.* 2002; 146(5): 810-815.PubMed. PMID: 20043092.
103. Ortonne JP. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma. *Br.J. Dermatol.* 2002; 46(61): 20-23. PubMed PMID: 11966728
104. Fischer SM. Prostaglandins and cancer. *Front.Biosci.*1997; 2:482-500.
105. Zhao W, Robbins ME. Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications. *Curr Med Chem* 2009;16(2):130-43. PubMed. PMID:19149566
106. Sampaio RNR, Cardoso NA. Câncer de pele no Distrito Federal: Resultado da Campanha de 1999. *Brasília Med* 2000; 37(3-4): 81-86.
107. Institute of Medicine. DRIs - Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Cooper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington (DC): National Academy Press, 2002.
108. Tatsch E, Bochi GV, Pereira RS, Kober H, Oliveira JR, Moresco RN. Influência dos anticoagulantes e da temperatura de Armazenamento sobre os níveis sanguíneos de nitrito. *J.Bras. Patol. Med. Lab.* 2011; 47(2): 147-150.
109. Ministério da Saúde. Brasil. Secretária de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, Coordenação Geral de Política de Alimentação e Nutrição.Vigilância Alimentar e Nutricional. SISVAN. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviço de saúde. Ministério da Saúde; 2008.7p.

110. Ministério da Saúde. Brasil. Secretária de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, Coordenação Geral de Política de Alimentação e Nutrição. Vigilância Alimentar e Nutricional. SISVAN. Orientações básicas para a coleta, o processamento, a análise de dados e a informação em serviços de saúde. Brasília. Ministério da Saúde; 2004. 122 p
111. Jelliffe DB. The assessment of the nutritional status of the community. Monogr Ser World Health Organ. Geneva. 1966; 53:3-271. 271p.
112. Blackburn GL, Bistrian BR. Nutritional and metabolic assessment of the hospitalized patient. JPEN 1977; 1:11-22
113. Kuczmarski MF, Kuczmarski RJ, Najjar RM. Descriptive anthropometric reference data for older Americans. J Am Diet Assoc 2000; 100:59-66.
114. World Health Organization (WHO). Physical status: use and interpretation of anthropometry. Geneva; 2004. 463p
115. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). División de Promoción y Protección de la Salud (HPP). XXXVI Reunión del Comité Asesor de Investigaciones en Salud – Encuesta Multicêntrica. Salud Bienestar y Envejecimiento (SABE) en América Latina e el Caribe. Informe preliminar. Washington, DC:OPAS; 2001. 19p.
116. Crispin SP, Ribeiro RCL, Panato E. Validade relativa de um questionário de frequência alimentar para utilização em adultos. Rev Nutr 2009; 22(1): 81-95.
117. Alencar MAPM, Alvarenga ESL, Mello MTCM. Medidas Caseiras: correspondência peso. Teresina: UFPI, 2005.
118. Anção MS, Cuppari L, Draibe SA, Sigulem D. Programa de apoio à nutrição - NutWin versão 1.5 [CD-ROM]. São Paulo: Departamento de Informática em Saúde - SPDM - Unifesp/EPM. 2002.

119. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA). Campinas: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) 4ª edição revisada e ampliada; 2011. 103p
120. Sichieri R, Everhart JE. *Validity of a Brazilian food frequency questionnaire against dietary recalls and estimated energy intake*. Rev Nutr 1998; 18(10):1649-59.
121. Willett WC, Stampfer MJ. Total energy intake: implications for epidemiologic analyses. Am J Epidemiol 1986; 124:17-27
122. Willett WC, Howe GR, Kushi LH. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. Am J Clin Nutr. 1997; 65: Suppl: S1220-S1228.
123. Stokes ME, Davis CS, Koch GG. Categorical Data Analysis Using the SAS System. SAS Institute Inc. Cary. NC. 1996.
124. Conover WJ. Practical Nonparametric Statistics. 3ª ed. John Wiley & Sons Inc. Nova York. 1999.
125. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. (CNS). Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Resolução nº 196, de 10 de Outubro de 1996. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF[internet] [acesso em 2012 março 20]. Disponível em <http://conselho.saúde.gov.br>
126. Becker TCA, Baptista F, Soave JS, Weiler MA, Lacerda MAM, Alves VS, Inácio FD. Perfil epidemiológico dos portadores de câncer de pele da comunidade dos municípios da região de Campo Mourão- Paraná. Rev Saúde e Biol 2010; 5(1): 51-58.
127. Borsato FG, Nunes EFPA. Neoplasia de pele não melanoma: Um agravo relacionado ao trabalho. Cienc. Cuid. Saúde 2009; 8(4):600-606.

128. Campos ECR, Simões JC, Kamei DJ, Santos FMR, Pinheiro EB A, Baldissera RL. Análise do perfil epidemiológico, clínico e patológico de pacientes portadores de câncer de pele não melanoma tratados no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. *Rev Med Res* 2011; 13 (4): 251-260.
129. Spindola EO, Yamasato K, Tamashiro CS, Matos OMP, Figueredo SS, Pita MJ, Albuquerque LF, Duarte IB, Gunter HF, Sassioto IS, Pita MVC. Prevalência de neoplasia de pele em Campo Grande, MS, 1993-2004. *Ensaio e C* 2006; 10(3): 161-170.
130. Rocha F P, Meneses AMB, Almeida Jr HL, Tomasi E. Marcadores e fatores de risco para queratoses actínicas e carcinomas basocelulares: um estudo de caso-controle. *An Bras Dermatol* 2004; 79(4):441-54.
131. Prado H. Câncer de pele no Piauí - 1964-1984: II. Carcinoma espinocelular. *An Bras Dermatol* 1987; 62(3):147-50.
132. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa Nacional por Amostra de domicílios. Síntese dos indicadores. Volume: Brasil, 2011. 290p
133. Mantese SAO, Berbert ACLV, Gomides MDA, Rocha A. Carcinoma basocelular - Análise de 300 casos observados em Uberlândia – MG. *An Bras Dermatol* 2006; 81(2):136-42.
134. Fabris MR, Durões ESM, Martignago BCF, Blanco LFO, Fabris TR. Avaliação do conhecimento quanto à prevenção do câncer de pele e sua relação com os hábitos da exposição solar e foto proteção em praticantes de academia de ginástica do sul de Santa Catarina, Brasil. *An Bras Dermatol*. 2012; 87(1):36-46.
135. Balogh TS, Velasco MVR, Pedriali CA, Kaneko TM, Baby AR. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *An Bras Dermatol*. 2011; 86(4):732-42.

136. Chinem VP, Miot HA. Prevalência de lesões cutâneas actínicas em pacientes com carcinoma basocelular do segmento cefálico: um estudo caso-controle. *Rev Assoc Med Bras.* 2012; 58(2):188-96.
137. Dantas ELR, Lima ASFH, Carvalho SMF, Arruda AP, Ribeiro EM. Genética do Câncer Hereditário. *Rev. Bras. Cancerol.* 2009; 55(3): 263-269.
138. Castilho IG, Sousa MAA, Leite RMS. Fotoexposição e fatores de risco para câncer da pele: uma avaliação de hábitos e conhecimentos entre estudantes universitários. *An Bras Dermatol* 2010; 85(2):173-8.
139. Pandel R, Poljsak B, Godic A, Dahmane R. Skin Photoaging and the role of antioxidant in its prevention. *ISRN Dermatol.* 2013; 2013:11.
140. Belli R, Amerio P, Brunetti L, Orlando G, Toto P, Progetto G, Vacca M, Tulli A. Elevated 8-isoprostane levels in basal cell carcinoma and in UVA irradiated skin. *Int.J. Immunopathol. Pharmacol.* 2005; 18(3): 497-502. PubMed. PMID: 16164830
141. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, Nyska A, Wachsman JT, Ames BN, Basu S, Brot N, Fitzgerald GA, Floyd RA, George M, Heinecke JW, Hatch GE, Hensley K, Lawson JA, Marnett LJ, Morrow JD, Murray DM, Plastaras J, Roberts LJ 2nd, Rokach J, Shigenaga MK, Sohal RS, Sun J, Tice RR, Van Thiel DH, Wellner D, Walter PB, Tomer KB, Mason RP, Barrett JC. Biomarkers of Oxidative Stress Study II: Are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl<sub>4</sub> poisoning? *Free Radic Biol Med.* 2005;38 (6): 698-710. PubMed. PMID: 15721980
142. Yeh CC, Hou MF, Tsai SM, Lin SK, Hsiao JK, Huang JC, Wang LH, Wu SH, Hou LA, Ma H, Tsai LY. Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clin Chim Acta.* 2005; 361:104-111. PubMed. PMID:16009358

143. Terra NL, Boschini RC. Mitos e verdades sobre terapias antienvhecimento. Revista AMRIGS 2004; 48 (4): 285-290.
144. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J.Clin Invest.2004; 114(12): 1752-1761.
145. Silva V.R.G. Marcadores pro-inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes submetidos a gastroplastia com bypass em y de roux. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Florianópolis, 2009. Disponível em <http://repositorio.ufsc.br>
146. Bogdan Allemann, I.; Baumann, L. Antioxidants used in skin care formulations. Skin Therapy Lett 2008; 13(7): 5-9.
147. Kuhn H M, Wolber R, Kolbe L, Schnorr O, Sies H. Erro! A referência de hiperlink não é válida.. Arch Dermatol Res 2006; 297(10): 477-479.
148. Marrow JD, Frei B, Longmire AWJ, Gaziano M, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts JL. Increase in Circulating Products of Lipid Peroxidation (F<sub>2</sub>-Isoprostanes) in Smokers — Smoking as a Cause of Oxidative Damage. N Engl J Med 1995 may4; 332(18):1198-1203.
149. Lykkesleldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. Clin Chim Acta 2007; 380(1-2):50-8
150. Barocas DA, Motley S, Cookson MS, Chang SS, Penson DF, Dai Q, Milne G, Roberts LJ 2nd, Morrow J, Concepcion RS, Smith JA Jr, Fowke JH. Oxidative Stress measured by Urine F<sub>2</sub>-Isoprostane level is associated with Prostate Cancer. J Urol 2011; 185(6): 2102-7.

151. Aghvami T, Djalali M, Keshavarz A, Sadeghi MR, Zeraati M, Sadrzadeh H, Yeganeh MN. Plasma Level of Antioxidant Vitamins and Lipid Peroxidation in Breast Cancer Patients. *Iranian J Publ Health* 2006; 35(1): 42-47.
152. Rockenbach G. Alterações no consumo alimentar e no estresse oxidativo demulheres com câncer de mama no período de tratamento antineoplásico. 2008. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008. Disponível em <http://repositorio.ufsc.br>.
153. Rajneesh CP, Manimaran A, Sasikala KR, Adaikappan P. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. *Singapore Med J*. 2008; 49(8): 640-44.
154. Godic A, Poljsak B, Adamic M, Dahmane R. The role of antioxidant in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.2014; 2014:6 Doi: 10.1155/2014/860479.
155. Dietrich M, Block G, Hudes M, Morrow J D, Norkus E P, Traber M G, Cross C E, Packer L. Antioxidant Supplementation Decreases Lipid Peroxidation Biomarker F<sub>2</sub>-isoprostanes in Plasma of Smokers .*Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002; 11:7-13.
156. Rabovsky A, Cuomo J, Eich N. Measurement of plasma antioxidant reserve after supplementation with various antioxidants in healthy subjects. *Clin Chim Acta*. 2006; 371: 55–60.
157. Qi Dai, Zhu Xiangzhu. F2 isoprostane, metabolites and risk breast cancer risk. *N Am J Med Sci*. 2009; 2(3): 106–108.
158. Ho E, Galougahi KK, Chilibu C, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practices. *Redox Biol*. 2013; 1: 483–491



159. Preziosi P, Galan P, Herbeth B, Valeix P, Roussel AM, Malvy D, Paul-Dauphin A, Arnaud J, Richard MJ, Briancon S, Favier A, Hercberg S. Effects of supplementation with a combination of antioxidant vitamins and trace elements, at nutritional doses, on biochemical indicators and markers of the antioxidant system in adult subjects. *J Am Coll Nutri* 1998; 17(3): 244-9. PubMed. PMID: 9627910.
160. Meagher EA, Barry OP, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Effects of vitamin E on lipidperoxidation in healthy persons. *JAMA* 2001; 285(9):1178-82.
161. Hopkins M, Fedirko V, Jones DP, Bostick RM. Antioxidant Micronutrients and biomarkers of oxidative stress and inflammation in colorectal adenoma patients: Results from a randomized controlled clinical trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(3):850-8.
162. McArdle F, Rhodes LE, Parslew R, Jack CIA, Friedmann PS, Jackson MJ. UVR-induced oxidative stress in human skin in vivo: effects of oral vitamin C supplementation. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33(10):1355–1362.
163. McArdle F, Rhodes LE, Parslew RAG, Close GL, Jack CIA, Friedmann PS, Jackson ML. Effects of oral vitamin E and  $\beta$  carotene supplementation on ultraviolet radiation–induced oxidative stress in human skin. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:1270-5.
164. Ritter EF, Axelrod M, Minn KW *et al.* Modulation of ultraviolet light-induced epidermal damage: beneficial effects of tocopherol. *Plast Reconstr Surg.* 1997; 100(4): 973–980.
165. Sies H, Stahl W.  $\beta$ -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. *Am J Clin Nutr* 2012; 96: (suppl):1179S–84S.

166. Heinrich U, Gärtner C, Wiebusch M, Eichler O, Sies H, Tronnier H, Stahl W. Supplementation with  $\beta$ -carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *J Nutr.* 2003; 133(1): 98–101.
167. Karagas MR, Greenberg ER, Nierenberg D, Stukel TA, Morris JS, Stevens MM, Baron JA. Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Skin in Relation to Plasma Selenium,  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotene, and Retinol: A Nested Case-Control Study<sup>1</sup>. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997; 6:25-29.
168. Hercberg S, Ezzedine K, Guinot C, Preziosi P, Galan P, Bertrais S, Estajio C, Briançon S, Favier A, Latreille J, Malvy D. Antioxidant Supplementation Increases the Risk of Skin Cancers in Women but Not in Men. *J Nutr.* 2007; 137: 2098–2105.
169. Greenberg ER, Baron JA, Stukel TA. A clinical trial of beta-carotene to prevent basal cell and squamous-cell cancers of the skin. *N Engl J. Med.* 1990; 323(12): 789–795.
170. Hennekens CH, Buring JE, Manson JE. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J. Med.* 1996; 334(18): 1145-1149.
171. McNaughton SA, Geoffrey C, Marks C, Adele G. Role of Dietary Factors in the Development of Basal Cell Cancer and Squamous Cell Cancer of the Skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14:1596-1607.
172. Albanes D, Heinonen OP, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M, Hartman AM, Palmgren J, Freedman L, Haapakoski J, Barrett TM, Pietinen P, Malita N, Tala E, Liippo K, Salomaa E R, Tangrea J A, Teppo L, Askin F B, Taskinen E, Erozan Y, Greenwald P, Huttunen J. Alpha-Tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base-line

- characteristics and study compliance. *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88(21): 1560-70.
173. Kirsh VA, Hayes RB, Mayne ST, Chatterjee N, Subar AF, Dixon NLB, Albanes D, Andriole GL, Urban DA, Peters U. Supplemental and dietary vitamin E, beta-carotene, and vitamin C intakes and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98(4): 245-54
174. Dolaro P, Bigagli E, Collins A. Antioxidant vitamins and mineral supplementation, life span expansion and cancer incidence: a critical commentary. *Eur J Nutr.* 2012; 51:769–781.
175. Myung SK, Kim Y, Ju W, Choi HJ, Bae WK. Effects of antioxidant supplements on cancer prevention: meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Oncol.* 2010; 21:166–179.
176. Choi SW, Benzie IF, Collins AR, Hannigan BM, Strain JJ. Vitamins C and E: acute interactive effects on biomarkers of antioxidant defence and oxidative stress. *Mutat Res.* 2004; 551(1-2):109-17.
177. Paiva SAR, Campana AO, Okoshi MP, Godoy I. Terapia nutricional como coadjuvante no tratamento do paciente com insuficiência cardíaca. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo* 2004; 14:186-96.
178. Tartari RF, Busnello FM, Nunes C H A. Perfil Nutricional de Pacientes em Tratamento Quimioterápico em um Ambulatório Especializado em Quimioterapia. *Rev Bras Cancerol.* 2010; 56(1): 43-50.
179. Wanderley F M, Cardoso R M, Liberali R, Coutinho V F. Estado nutricional de pacientes com neoplasia: revisão sistemática. *Ensaio e C.* 2011; 15(4):167-82. pp. 167-182,
180. Gómez- Candela C, Luengo, Cos et al. Valoración global subjetiva en el paciente neoplásico. *Nutr Hosp.* 2003; 18(6): 353-357.

181. Zorlini R, Cairo AAA, Gurgel MSC. Nutritional status of patients with gynecologic and breast cancer. *Nutr Hosp.* 2008; 23(6): 577-583.
182. Azevedo DC, Bosco MS. Perfil nutricional, dietético e qualidade de vida de pacientes em tratamento quimioterápico. *ConScientiae Saúde.* 2001; 10(1): 23-30.
183. Caro MMM, Gómez-Candela, Rabaneda *et al.* Evaluación del riesgo nutricional e instauración de soporte nutricional em pacientes oncológicos, según el protocolo del grupo español de Nutrición y Cáncer. *Nutr Hosp.* 2008; 23(5): 458-468.
184. World Center Research Fund / American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington, DC: AICR, 2007. 537p.
185. Campos MTF, Monteiro JBR, Ornelas APRC. Fatores que afetam o consumo alimentar e a nutrição do idoso. *Rev Nutr.* 2000; 13(3):157-165.
186. Farinatti PT. Teorias biológicas do envelhecimento: do genético ao estocástico. *Rev Bras Med Esporte* 2002;8(4):129-138. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php>
187. Bites APJ, Oliveira TR, Fortes RC. Perfil antropométrico de pacientes com câncer colorretal. *J Health Sci Inst.* 2012; 30(4):382-6.
188. Miranda TV, Neves FMG, Costa GNR, Souza MAM. Estado Nutricional e Qualidade de Vida de Pacientes em Tratamento Quimioterápico. *Rev Bras Cancerol* 2013; 59(1): 57-64.
190. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Trabalho e Rendimento, Pesquisa de Orçamentos Familiares. 2008-2009. 54p

191. Philippi ST, Latterza AR, Cruz ATR, Ribeiro LC. Pirâmide alimentar adaptada: guia para escolha dos alimentos. *Rev Nutr.* 1999; 12(1):65-80.
192. Malta MB, Papini SJ, Corrente JE. Avaliação da alimentação de idosos de município paulista - aplicação do Índice de Alimentação Saudável. *Ciênc. Saúde coletiva.* 2013; 18(2):377-84. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php>
193. Toral N, Gubert MB. Schmitz BAS. Perfil da alimentação oferecida em instituições geriátricas do Distrito Federal. *Rev Nutri.* 2006; 19(1): 29-37. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php>
194. Carvalho EO, Rocha EF. Consumo alimentar de população adulta residente em área rural da cidade de Ibatiba (ES, Brasil). *Ciênc. Saúde coletiva.* 2011; 16(1): 179-85.
195. Panziera FB, Dorneles MM, Durgante PC, Silva VL. Avaliação da ingestão de minerais antioxidantes em idosos. *Rev Bras Geriatr Gerontol.* 2011; 14(1):49-58
196. Figueiredo ICR, Jaime PC, Monteiro CA. Fatores associados ao consumo de frutas, legumes e verduras em adultos da cidade de São Paulo. *Rev. Saúde Pública.* 2008; 42(5): 2365-74..
197. Martins MPSC, Gomes ALM, Marins MCC, Matos MA, Sousa Filho MD, Mello DB, Dantas EHM. Consumo alimentar, Pressão Arterial e controle metabólico em idosos diabéticos e hipertensos. *Rev Bras Cardiol.* 2010; 23(3):162-170.
198. Viebig RF, Valero MP, Scazufca M, Meneses P. Consumo de frutas e hortaliças por idosos de baixa renda na cidade de São Paulo. *Rev Saúde Pública [serial on the Internet].* 2009 Oct;43(5): 806-813. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php>.

199. Ministério da Saúde. Brasil. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável– Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 236p.
200. Thompson HJ, Heimendinger J, Haegele A, Diker A, O'Neil C, Meineque B, Wolfe P, Zhu Z, Jiang W. 8-Isoprostane F<sub>2</sub> excretion is reduced in women by increased vegetable and fruit intake. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82:768 –76.
201. Nanri A, Yoshida D, Yamaji T, Mizoue T, Takayanagi R, Kono S. Dietary patterns and C-reactive protein in Japanese men and women. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87(5):1488-96
202. Verde SMML. Impacto do tratamento quimioterápico no estado nutricional e comportamento alimentar nos pacientes com neoplasia mamária e suas conseqüências na qualidade de vida. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Nutrição, São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2007. 138p. disponível em <http://www.teses.usp.br>
203. Souza AM, Pereira RA, Yokoo EM, Levy RB, Sichieri R. Alimentos mais consumidos no Brasil: Inquérito Nacional de Alimentação 2008-2009. *Rev. Saúde Pública.* [Serial on the Internet] 2013 Feb [cited 2014 May 27]; 47(Suppl 1): 190s-199s. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php>.
204. Firme LE, Gallon CW. Perfil Nutricional de Pacientes com Carcinoma Esofágico de um Hospital Público de Caxias do Sul. *Rev Bras Cancerol.* 2010; 56(4): 443-451.
205. Silva JVFP, Moreira SLN, Oliveira DC, Santos TR, Gadilha HG, Stulbach T, Crispim C. Avaliação do consumo de nutrientes antioxidantes por mulheres fisicamente ativas. *Braz J Spor Nutri.* 2012; 1(1): 30–36.

206. Fernandes M, Paes C, Nogueira C, Souza G, Aquino L, Borges F, Ramalho A. Perfil de consumo de nutrientes antioxidantes em pacientes com síndrome metabólica. *Rev Cienc Med.* 2007; 16(4/6): 209-219.
207. Lopes ACS, Caiaffa WT, Sichieri R, Mingoti SA, Costa MFL. Consumo de nutrientes em adultos e idosos em estudo de base populacional: Projeto Bambuí. *Cad Saúde Pública.* [Serial on the Internet]. 2005 Aug;21(4):1201-1209. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php>.
208. Leão ALM, Santos LC. Consumo de micronutrientes e excesso de peso: existe relação? *Rev bras epidemiol.* 2012; 15(1):85-95.
209. Fuchs-Tarlovsky V, Bejarano-Rosales M, Gutierrez-Salmean G, Casillas MA. Efecto de la suplementación con antioxidantes sobre el estrés oxidativo y la calidad de vida durante el tratamiento oncológico en pacientes con cáncer cérvico uterino. *Nutri Hosp. Revista en la Internet.* 2011 Ago; 26(4): 819-826. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/scielo.php>.
210. Janicka M, Kot-Wasik A, Kot J, Namiesnik J. Isoprostanes-Biomarkers of Lipid Peroxidation: Their Utility in Evaluating Oxidative Stress and Analysis. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 4631-4659.
211. Rossner JRP, Gammon MD, Terry MB, Agrawal M, Zhang FF, Teitelbaum SL, Eng SM, Gaudet MM, Neugut AI, Santella RM. Relationship between Urinary 15-F2t-Isoprostane and 8-Oxodeoxyguanosine Levels and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(4):639-44..
212. Epplein M, Franke AA, Cooney RV, Morris JS, Wilkens LR, Goodman MT, Murphy SP, Henderson BE, Kolonel LN, Marchand LL. Association of plasma micronutrient levels and urinary isoprostane with risk of lung cancer: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(7): 1962–1970.

213. Cai F, Dupertuis YM, Pichard C. Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation on colorectal cancer risk and treatments. *Curr Opin Clin Nutri Metab Care* 2012; 15(2): 99-106. Doi: 10.1097/MCO.0b013e32834feab4
214. Qureshi AA, Francine L, Graham A, Colditz MD, Hunter DJ. Arch Geographic Variation and Risk of Skin Cancer in US. Women Differences between Melanoma, Squamous Cell Carcinoma, and Basal Cell Carcinoma. *Arch Intern Med.* 2008; 168(5): 501-507. PubMed. PMID: 18332296
215. Madan V, Lear JT, Szeimies RM. Non-melanoma skin cancer. *Lancet.* 2010; 375(9715):673-85.
216. Psotová J, Zahálková J, Hrbáč J, Šimánek V, Bartek J. Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry. Two case reports. *Biomed. Papers.* 2001; 145(2): 81–83



**ANEXOS**





## ANEXO 1

### QUESTIONÁRIO SEMIQUANTITATIVO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

INSTRUÇÕES: Indicar o número de dias da semana em que consome determinado item, conforme exemplo indicado abaixo:

Se come determinado alimentos todos os dias, marcar 7.

Se come determinado alimento 3 dias/semana, marcar 3.

Se come determinado alimento 3 dias/mês, marcar T.

Se come determinado alimento quinzenalmente, marcar Q.

Se nunca come determinado alimento, marcar R.

Visualização:

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R
7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R
7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R
7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R
7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R

Depois, indicar a quantidade que ingeriu, conforme o tamanho que mais se aproxime (A, B, C, e E), observado com auxílio do álbum fotográfico (não apresentado).

Exemplo: Come todos os dias 1 banana conforme tamanho C.

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

#### CARNES E PESCADOS

##### Almôndegas

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										30g	45g	60g	90g	120g

##### Bife de boi.

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										42g	85g	120g	165g	200g

##### Carne moída.

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										41g	82g	135g	180g	225g

**Frango.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										20g	65g	90g	160g	230g

**Linguiça.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										41g	75g	100g	120g	165g

**Peixe.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										45g	80g	100g	185g	240g

**Ovo****Ovo frito.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										50g	100g	150g	200g	250g

**LEITE E DERIVADOS.****Leite de vaca integral**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										100 mL	165mL	230mL	330mL	750mL

**Leite em Pó.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										7g	27g	54g	81g	100g

**Mussarela.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										15g	30g	45g	60g	95g

**Queijo Minas.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										17g	30g	45g	110g	164g

**CEREAIS E FARINHAS****Angu.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										15g	30g	70g	120g	200g

**Arroz.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										41g	71g	110g	150g	233g

**Biscoito *cream-cracker*.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										8g	28g	65g	100g	200g

**Bolo básico.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										30g	40g	60g	90g	120g

**Coxinha.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										20g	42g	75g	115g	155g

**Farofa.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										10g	22g	40g	75g	100g

**Macarrão.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										50g	100g	130g	200g	280g

**Pão de Queijo.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										40g	85g	130g	250g	480g

**Pão Francês.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	½	1	2	3	4
										25g	50g	100g	150g	(unidades) 200g

**Pão de Forma.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	1	2	3	4	5 (fatias)
										25g	50g	75g	100g	125g

**Pastel.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										20g	50g	70g	100g	125g

**Pipoca.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										15g	30g	50g	65g	80g

**Pizza.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										85g	140g	190g	230g	330g

**LEGUMINOSAS.****Feijão cozido.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										35g	71g	142g	200g	270g

**HORTALIÇAS GRUPO A.****Alface.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										10g	35g	60g	80g	100g

**Almeirão.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										15g	35g	45g	60g	80g

**Berinjela.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										30g	43g	60g	75g	105g

**Brócolis.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										10g	20g	40g	60g	100g

**Couve crua.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										10g	20g	36g	60g	80g

**Couve refogada.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										10g	20g	36g	60g	80g

**Couve flor.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										30g	60g	103g	214g	321g

**Pepino.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										22g	42g	74g	85g	100g

**Tomate.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										15g	30g	50g	75g	140g

**HORTALIÇAS GRUPO B.****Cenoura.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										10g	25g	40g	80g	130g

**Beterraba.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										14g	30g	52g	85g	110g

**HORTALIÇAS GRUPO C.****Batata baroa.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										60g	85g	120g	180g	240g

**Batata frita.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										25g	50g	80g	100g	150g

**Mandioca cozida**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										30g	60g	90g	130g	210g

**Mandioca frita**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										30g	60g	90g	130g	210g

**FRUTAS GRUPO A.****Melão.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										70g	140g	210g	280g	410g

**Laranja.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										90g	120g	189g	370g	500g

**FRUTAS GRUPO B.****Abacaxi.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										75g	150g	300g	375g	540g

**Banana.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										75g	105g	120g	210g	225g

**Maçã.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										40g	80g	130g	150g	240g

**Mamão.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										70g	140g	280g	420g	580g

**Uva.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										40g	80g	120g	176g	350g

**DOCES.****Bombom.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										12g	20g	30g	60g	100g

**Cajuzinho.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										10g	20g	40g	60g	120g

**Doce de leite pastoso.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										35g	60g	90g	120g	200g

**Doce de leite pedaço.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										35g	60g	90g	120g	200g

**Gelatina.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										65g	130g	200g	330g	500g

**Goiabada.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										45g	60g	100g	120g	175g

**Chocolate em pó.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										8g	16g	32g	48g	64g



**BEBIDAS E INFUSÕES.****Café.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										50g	100g	165g	240g	330g

**ÓLEOS E GORDURAS.****Margarina.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										8g	16g	24g	40g	80g

**DIVERSOS.****Purê de batata.**

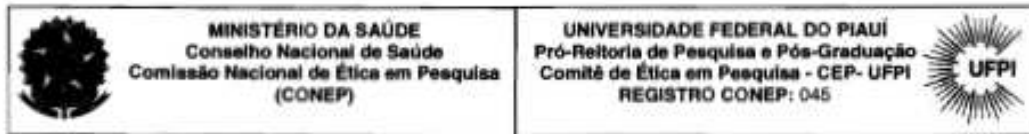
7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										25g	45g	80g	135g	200g

**Salada de legumes com maionese.**

7	6	5	4	3	2	1	T	Q	R	A	B	C	D	E
										35g	70g	140g	210g	280g



**ANEXO 2**  
**CARTA DE APROVAÇÃO - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



**CARTA DE APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

**Título:** Efeito da suplementação de vitaminas C, E e Zinco no estresse oxidativo de pacientes portadores de câncer de pele em Teresina Piauí.  
**CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética):** 0055.0.045.000-10  
**Pesquisador Responsável:** Betânia e Silva de Almendra Freitas

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Junho/2011	Relatório parcial
Setembro/2012	Relatório final

Os membros do CEP-UFPI não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

**DATA DA APROVAÇÃO:** 17/05/2010

Teresina, 18 de maio de 2010.

  
Prof. Dr. Carlos Ernando da Silva  
Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI  
COORDENADOR



## APÊNDICES





**APÊNDICE 1**  
**FICHA DE ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES COM CÂNCER DE PELE**  
**NÃO MELANOMA**

01.DADOS PESSOAIS E HÁBITOS DE VIDA

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: M  F

Telefone: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

Diagnóstico Principal: \_\_\_\_\_

Data de admissão: \_\_\_\_\_ Doença associada: \_\_\_\_\_

TTM cirúrgico: S  N  Procedimento: \_\_\_\_\_

Cor da pele: Branca  Parda  Negra

Ocupação atual: \_\_\_\_\_

Ocupação na idade produtiva: \_\_\_\_\_

Hábitos de vida e de exposição ao sol

Por quanto tempo você se expõe diretamente ao sol:

até 30 minuto/dia

31- 90 minutos/dia

91-120 minutos/dia

121- 200min/dia

Quais são os horários que comumente você se expõe ao sol (mais de uma alternativa podem ser assinaladas):

Até as 10 horas da manhã

Entre 10 horas da manhã e 3 horas da tarde

Após as 3 horas da tarde

Não me exponho ao sol

Você usa filtro solar?

sim  não

Qual a frequência de uso do protetor solar?

Diariamente

Três ou mais vezes na semana

Menos de três vezes na semana

Uso filtro solar somente quando vou à praia ou piscina

Você tem o hábito de fumar:

Sim      Quantos por dia: \_\_\_\_\_

Não

ex Fumante      Há quanto tempo parou: \_\_\_\_\_

Você tem o hábito de consumir álcool:

raramente/ nunca

eventualmente

sempre

Você tem antecedentes familiares de caso de câncer: Sim  Não  Tipo: \_\_\_\_\_

## 02. DADOS ANTROPOMÉTRICOS

PESO ATUAL	
PESO USUAL	
ESTATURA	
IMC	
PCT	
CB	



## APÊNDICE 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa (IV, da Res. 196/96, do CNS).

**Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a), em uma pesquisa.**

Para melhor esclarecer, o sujeito de pesquisa, de acordo com a Resolução 196/96, do CNS, é o (a) participante pesquisado (a), individual ou coletivamente, **de caráter voluntário, vedada qualquer forma de remuneração.**

Por favor, não se apresse em tomar a decisão.

Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pela pesquisa sobre qualquer dúvida que tiver.

Após ser **esclarecido (a)** sobre as informações a seguir, no caso de autorizar sua participação como sujeito de pesquisa, assine este documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

**Você poderá recusar sua participação de imediato e a qualquer tempo sem que com isto haja qualquer penalidade. Você pode desistir em qualquer momento da pesquisa.**

#### ESCLARECIMENTO SOBRE A PESQUISA:

O Projeto de Pesquisa intitulado: POSSÍVEIS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA C, E MINERAL ZINCO EM INDIVÍDUOS QUE TIVERAM CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA, tem como pesquisadora responsável: Betânia e Silva de Almendra Freitas, cujo telefone para contato é (86) 9419 3324 e E-mail: betaniafreitas2004@yahoo.com.br.

A pesquisa tem como objeto indivíduos previamente diagnosticados e já tratados por câncer de pele não melanoma atendidos no Hospital Getúlio Vargas em Teresina PI. Os procedimentos adotados nesta pesquisa são: avaliar o estado nutricional dos sujeitos; comparar o estresse oxidativo por meio da análise sérica dos biomarcadores do estresse oxidativo: isoprostanos, nitrito, TBARS, capacidade antioxidante total de pessoas que tiveram e não tiveram câncer de pele não melanoma; verificar o efeito da suplementação combinada de nutrientes antioxidantes sobre os marcadores de estresse oxidativo; verificar o consumo habitual relativo aos nutrientes antioxidantes.

Há benefícios para o sujeito de pesquisa, pois após a realização da mesma os sujeitos conhecerão seu perfil oxidativo/antioxidativo e os efeitos da suplementação de nutrientes antioxidantes no estresse oxidativo dos sujeitos, o que permitirá consolidar a adoção de medidas de intervenções adequadas e direcionadas para minimizar os danos oxidativos sobre a pele, evitando futuras recidivas, além de promover adaptações no seu esquema alimentar, sem existir custos para os participantes.

Objetiva-se nesta pesquisa: Comparar os marcadores de estresse oxidativo de indivíduos que tiveram e não tiveram CPNM e avaliar os efeitos da suplementação combinada de nutrientes antioxidantes Vitamina E, C e Zinco no estresse oxidativo de pacientes previamente diagnosticadas e já tratados por câncer de pele.

Ressalta-se que em qualquer etapa da pesquisa, você terá acesso aos pesquisadores responsáveis e participantes pela presente pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

O principal pesquisador é: Betânia e Silva de Almendra Freitas, Rua Aviador Irapuã Rocha, 1065. Teresina – Piauí; CEP-64.048-360, (086) 9419 3324, betaniafreitas2004@yahoo.com.br.

O período de sua participação será de 01/01/2012 a 30/12/2012, lembrando-lhe que você terá o direito de recusar-se a continuar como sujeito de pesquisa a qualquer tempo.

Nome e Assinatura do pesquisador responsável:

---

Nome e Assinatura do(s) pesquisador (es) participante(s):

---

---

---