



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO

DANO OXIDATIVO NO DNA DE LINFÓCITOS DE
INDIVÍDUOS COM RISCO CARDIOVASCULAR
COM E SEM EXCESSO DE PESO

THAMIRES AGUIAR SILVA

Cuiabá – MT, Abril de 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO

**DANO OXIDATIVO NO DNA DE LINFÓCITOS DE
INDIVÍDUOS COM RISCO CARDIOVASCULAR
COM E SEM EXCESSO DE PESO**

THAMIRES AGUIAR SILVA

Trabalho apresentado ao curso de Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Bacharel em Nutrição, sob orientação da professora Msc^a Naoel Hassan Feres e coorientação da prof^a Dr^a Carmen Lúcia Bassi Branco.

Cuiabá – MT, Abril de 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

S586d Silva, Thamires Aguiar.
Dano oxidativo no DNA de linfócitos de indivíduos com e sem excesso de peso /
Thamires Aguiar Silva. -- 2019
35 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Prof^a Msc. Naoel Hassan Feres.
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Carmen Lúcia Bassi Branco.
TCC (graduação em Nutrição) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade
de Nutrição, Cuiabá, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Risco cardiovascular. 2. excesso de peso. 3. dano oxidativo no DNA. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO

DANO OXIDATIVO NO DNA DE LINFÓCITOS
DE INDIVÍDUOS COM RISCO CARDIOVASCULAR
COM E SEM EXCESSO DE PESO

THAMIRES AGUIAR SILVA

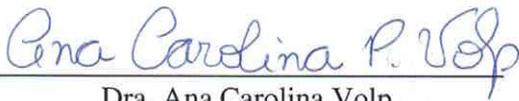
Orientador:

Prof^a Ms. Naoel Hassan Feres

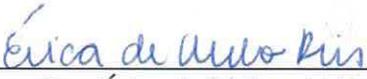
MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA



Ms. Naoel Hassan Feres



Dra. Ana Carolina Volp



Dra. Érica de Melo reis

JULGADO EM: 12/04/2019

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por Sua presença real em minha vida. Por dar-me sabedoria e graça em cada escolha fundamental para meu sucesso profissional e pessoal.

Agradeço à minha família por todo apoio, pois foram indispensáveis para a iniciação de um longo caminho ainda a percorrer e pelo auxílio me ajudando chegar até aqui. Em especial à minha mãe, por me estimular a reconhecer forças em mim que até então não eram estimadas, por todo seu cuidado, cumplicidade, dedicação e amor.

À Prof.^a Carmem Lúcia Bassi Branco, pela oportunidade concedendo-me livre acesso ao laboratório, compartilhando comigo seu conhecimento e competência para a elaboração deste estudo.

À Prof.^a Naoel Hassan Feres, por sua prestatividade, orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho. Sua orientação foi fundamental para meu conhecimento e amadurecimento científico.

À Prof.^a Silvia Regina Lima Reis, pela partilha de saberes, por sua dedicação e horas de trabalho fundamentais para este estudo. Por acima de tudo, ter se tornado uma grande amiga durante os dias de tensão. Não tenho palavras para lhe agradecer!

Agradeço aos participantes da pesquisa que aceitaram contribuir para este trabalho, sem o qual não seria possível concluir com sucesso.

À Faculdade de Nutrição por contribuir com minha formação profissional.

Aos amigos do laboratório, pelo companheirismo e incentivo para este trabalho, pelos momentos de descontração que elevavam minha alegria todos os dias.

A meus amigos que presenciaram toda minha alegria e angústias que nortearam este trabalho. Aos que me acolheram, apoiaram e incentivaram a minha vida profissional e que acima de tudo, compreenderem minha ausência quando deveria estar por perto. Vocês são excepcionais!

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para meu sucesso e crescimento, e que tornaram o caminho mais curto e prazeroso. Sou resultado da confiança de cada um de vocês. Obrigada por todo amparo, incentivo e apoio que me proporcionaram.

A todos, muito obrigada!

Epigrafe

*“Nada do que vivemos faz sentido se não
tocarmos o coração das pessoas.”*

Cora Coralina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Geral.....	14
2.2 Específicos.....	14
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	15
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	15
3.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	15
3.3 SUJEITOS DA PESQUISA.....	15
3.4 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL.....	16
3.5 DETERMINAÇÃO DO DANO OXIDATIVO NO DNA.....	16
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
ANEXOS E APÊNDICES.....	29

RESUMO

A elevada taxa de prevalência e o aumento da ocorrência de mortes por Doença Cardiovasculares (DCVs) têm sido relacionados à frequência de fatores de risco modificáveis presentes na população. Dentre os fatores de risco, o excesso de peso está associado ao aumento de dano oxidativo no DNA, podendo promover o desenvolvimento das DCVs. O objetivo desse trabalho foi avaliar o dano oxidativo no DNA de indivíduos com risco cardiovascular (RCV) com excesso de peso ($>25 \text{ Kg/m}^2$) e sem. Analisou-se o estilo de vida e dados antropométricos de 40 indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 20 e 59 anos, com algum fator de risco para doença cardiovascular. O dano oxidativo basal no DNA foi determinado por meio do ensaio do cometa modificado com a enzima DNA-formamidopirimidina glicosilase (FPG). A idade média foi de $41 \pm 9,2$ anos, sendo 50% ($n=20$) do sexo masculino e 50% ($n=20$) do sexo feminino, com IMC médio de $30,88 \pm 3,55 \text{ kg/m}^2$, sendo 80% ($n=32$) com excesso de peso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) e 20% ($n=8$) sem excesso de peso, apresentando razão cintura quadril de $0,87 \pm 0,07$ e $0,7 \pm 0,09$, respectivamente. Encontramos maior frequência de % dano oxidativo no DNA no grupo com excesso de peso (15,09%) quando comparado ao grupo sem excesso de peso (11,02%), porém sem diferença ($p=0,685$). Portanto, conclui-se que apesar da alta prevalência de sobrepeso e obesidade na amostra estudada, não houve diferenças significativas de dano oxidativo no DNA nos grupos com e sem excesso de peso com RCV.

PLAVRA-CHAVE: Risco cardiovascular; excesso de peso; dano oxidativo no DNA.

ABSTRACT

The high prevalence rate and the increase in the occurrence of deaths due to Cardiovascular Disease (CVD) have been related to the frequency of modifiable risk factors present in the population. Among the risk factors, excess weight is associated with increased oxidative damage in the DNA and may promote the development of CVDs. The objective of this work was to evaluate the oxidative DNA damage of individuals with cardiovascular risk (CVR) with excess weight ($> 25 \text{ kg / m}^2$) and without. The lifestyle and anthropometric data of 40 individuals of both sexes, aged between 20 and 59 years, with some risk factors for cardiovascular disease were analyzed. The basal oxidative damage in the DNA was determined by the comet assay modified with the enzyme DNA-formamidopyrimidine glycosylase (FPG). The mean age was 41 ± 9.2 years, with 50% ($n = 20$) males and 50% ($n = 20$) females, with a mean BMI of $30.88 \pm 3.55 \text{ kg / m}^2$, 80% ($n = 32$) with excess weight ($\text{BMI} \geq 25 \text{ kg / m}^2$) and 20% ($n = 8$) without excess weight, presenting waist ratio of 0.87 ± 0.07 and 0.7 ± 0.09 , respectively. We found a higher frequency of DNA oxidative damage in the overweight group (15.09%) when compared to the non-overweight group (11.02%), but with no difference ($p = 0.685$). Therefore, it was concluded that despite the high prevalence of overweight and obesity in the studied sample, there were no significant differences in oxidative DNA damage in the groups with and without overweight with RCV.

KEY WORDS: Cardiovascular risk; overweight; oxidative non-DNA damage.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) destaca que, atualmente as doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte no mundo. Em 2015 a estimativa foi de que 17,7 milhões de pessoas morreram por essas doenças, representando 31% de todas as mortes a nível global¹. Somente no Brasil, desde 2004 até 2014, as DCVs foram responsáveis por 3.493.459 óbitos, totalizando 29% de todas as mortes, e em 2016 a estimativa chegou a 349.938 de óbitos².

A elevada taxa de prevalência e o aumento da ocorrência de mortes por DCVs têm sido relacionados à frequência de fatores de risco presentes na população, principalmente quando associados³. Entre os principais fatores de risco estão a alimentação inadequada, sedentarismo, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, hiperglicemia, hiperlipidemia, idade, sobrepeso e obesidade⁴.

O excesso de peso e obesidade, caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal resultante do desequilíbrio energético prolongado entre excesso de consumo de calorias e gasto energético é um componente de risco fundamental para as DCVs, talvez um dos mais preocupantes para a saúde pública. Nos últimos anos, a taxa de sobrepeso e obesidade tem aumentando consideravelmente. Em 2016 a taxa de sobrepeso em adultos com mais de 18 anos chegou a 1,9 bilhão, dos quais mais de 650 milhões estavam obesos⁵.

Segundo dados do Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), no Brasil, o excesso de peso cresceu 26,3% em dez anos, passando de 42,6% em 2006 para 53,8% em 2016, já a obesidade cresceu 60% passando de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2016, sendo que na cidade de Cuiabá a prevalência de excesso de peso foi de 49,7% nas mulheres e de 65,8% nos homens, maior que nas pesquisas anteriores^{6,7}.

Existem diversos métodos e técnicas para estimar a composição corporal, como dobras cutâneas, relação cintura-quadril, ultrassom, ressonância magnética, entre outras. Entretanto, devido a sua simplicidade de obtenção, baixo custo e correlação com a gordura corporal, o índice de massa corporal (IMC) tem sido amplamente utilizado e aceito. Além disso, apresenta a medida mais útil do nível populacional de sobrepeso e obesidade, pois é o mesmo para ambos os sexos e para todas as idades dos adultos^{8,6}.

Segundo a OMS, o IMC é obtido a partir da razão do peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros (kg/m^2). Valores de IMC acima de 25,0 kg/m^2

caracterizam excesso de peso, sendo que, valores de 25,0 kg/ m² a 29,9 kg/m² correspondem a sobrepeso e valores de IMC \geq 30,0 kg/m² classificam a obesidade^{8,9} (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação de peso pelo IMC (WHO, 2000)

Classificação	IMC (kg/m²)	Risco de comorbidades
Baixo peso	<18,5	Baixo
Peso normal	18,5 - 24,9	Médio
Sobrepeso	\geq 25	-
Pré-obeso	25,0 - 29,9	Aumentado
Obeso I	30,0 - 34,9	Moderado
Obeso II	35,0 - 39,9	Grave
Obeso III	\geq 40,0	Muito grave

Essas classificações são baseadas em evidências que sugerem que estes valores de IMC estão associados ao risco de doenças como diabetes tipo II, hiperlipidemia, câncer de cólon, morte súbita e outras doenças cardiovasculares. O sobrepeso e a obesidade também estão associados a distúrbios psicológicos, incluindo depressão, distúrbios alimentares, imagem corporal distorcida e baixa auto-estima. Sendo que as prevalências de ansiedade e depressão são de três a quatro vezes mais altas entre indivíduos obesos. Além de todas essas alterações, no metabolismo, a presença de adipócitos está associada ao aumento da produção de moléculas bioativas e síntese de óxido nítrico sintetase 2, que é fator para ativação das espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas espécies também são ativadas na obesidade devido à sobrecarga mecânicas e metabólicas no miocárdio, aumentando assim o estresse oxidativo nesses indivíduos^{10,11,12}.

Um outro fator de risco que também pode promover o aparecimento de DCVs são os danos oxidativos causados na molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA), consequentemente podem ser gerado pelo estresse oxidativo celular¹³.

A está presente no núcleo celular dos seres vivos e é responsável por armazenar as informações genéticas para a formação de proteínas específicas fundamentais ao seu desenvolvimento e funcionamento. Possui estrutura em dupla-hélice que consiste em duas fitas complementares de nucleotídeos que se enrolam, uma em torno da outra, ligadas por pontes de hidrogênio entre si. Dessa forma o DNA é condensado com o

auxílio das proteínas histonas formando assim os cromossomos. Durante o ciclo celular, os cromossomos são duplicados originando uma cópia completa do DNA chamada cromátides-irmãs que permanecem ligadas pelo centrômero¹⁴.

O processo de danos nessa molécula pode ocorrer por diversas causas, dentre elas a administração de fármacos, a radiação ultravioleta, radiações ionizantes, componentes tóxicos ambientais, e principalmente pelo aumento de estresse oxidativo decorrente da produção endógena de radicais livres que não foram reparados ou por algum defeito nas enzimas antioxidantes do organismo^{13,15}.

O estresse oxidativo surge quando o sistema antioxidante celular não consegue atuar sobre as substâncias oxidativas que são liberadas naturalmente pelas células como parte integrante do metabolismo do O₂ e também em situações não fisiológicas, como a exposição a outros agentes nocivos¹⁵.

A produção de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) é um processo natural nos seres vivos, contínuo e fisiológico, visto que estas espécies são utilizadas durante a defesa do organismo frente a um patógeno invasor e possuem funções como a sinalização celular e ainda atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas durante processos metabólicos¹².

Esses radicais são produzidos normalmente nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma, onde podem ser favorecidos pelos íons ferro e cobre. Destes, a mitocôndria é a principal fonte geradora por meio da cadeia transportadora de elétrons, durante a glicólise (processo de produção de energia a partir da glicose e oxigênio). Outra importante fonte geradora desses radicais é a enzima NADPH oxidase (proteínas de membrana), que tem a função de transferir elétrons por meio das membranas celulares¹⁶.

O estresse oxidativo, induzido principalmente pelas EROS, pode desencadear diversos problemas biológicos, uma vez que reagem com as mais diversas moléculas biológicas celulares, e são capazes de provocar danos a proteínas, lipídios e ao material genético. Esses danos no DNA provocam instabilidade genômica e maior susceptibilidade a quebras do material genético, além de interferir em processos como a transcrição e replicação, bem como mutações e, ou apoptose celular. Essas taxas de danos são ainda mais elevadas na resposta inflamatória onde a produção de EROs ocorre inevitavelmente, prejudicando os mecanismos de reparo do DNA. Estes danos aumentam drasticamente ou aparecem devido a influência de alguns agentes externos ou internos e ainda quando a produção endógena de radicais livres for alta^{13,17}.

Evidencialmente, o aumento de estresse oxidativo e conseqüentemente o acúmulo desses danos no DNA tem associação com a progressão de doenças, como o hepatocarcinoma celular e é também apontado como fator prejudicial à saúde, sendo, portanto, um distúrbio constituinte de papel crítico na patogênese e no desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade e às DCVs^{12,15,18,19}.

Quanto as DCVs, alguns estudos têm demonstrado que o dano oxidativo no DNA está relacionado à formação de placa aterosclerótica, infarto agudo do miocárdio, hipertensão arterial, doença coronariana e até a falência cardíaca^{20,21,22,23}.

Frente a essa condição, nosso organismo dispõe de uma vasta e eficiente cadeia de enzimas e moléculas antioxidantes, que visam prevenir os efeitos danosos da produção das EROs e ERNs^{12,16}. Porém, essa resposta antioxidante varia conforme a composição corporal, o estado fisiológico, o hábito alimentar e o tecido atingido de cada indivíduo²⁴.

O sistema de defesa antioxidante celular usualmente é dividido em enzimático (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e não-enzimático (substâncias antioxidantes de origem endógena ou dietética)¹⁶. O sistema não enzimático tem a função de reparar as lesões ocasionadas pelo estresse oxidativo, participando com ação detoxificadora do agente, antes mesmo de causar os danos²⁵.

A capacidade de defesa dos antioxidantes é expressa pela qualidade dos nutrientes da dieta (vitaminas, minerais, aminoácidos). Tais nutrientes provenientes dos alimentos como frutas, verduras e legumes possuem funções antioxidantes que retiram radicais livres do organismo, diminuindo ou removendo danos da molécula de DNA, bem como a reconstituição das membranas celulares danificadas. A ação antioxidante desses nutrientes está relacionada com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres^{25,26}. Porém, falhas nesse mecanismo causadas pela diminuição da expressão gênica têm sido relacionadas com maior predisposição ao desenvolvimento de neoplasias e DCVs^{27,28}.

Em danos no DNA procedentes de estresse oxidativo, as principais alterações genéticas são causadas por substituição das bases ou inserções e eliminações de alguns nucleotídeos da fita de DNA; ampliações gênicas; perdas ou ganhos de cromossomos inteiros e aberrações cromossômicas. A ocorrência desses danos acarreta numa maior susceptibilidade às quebras do material genético, sendo as mais comuns quebras de fita simples ou dupla nas cromátides-irmãs¹³.

Na busca por manter a molécula de DNA estável diante das alterações em sua estrutura, sequência ou composição gênica e por manter seu funcionamento adequado,

além do sistema protetor antioxidante, a célula dispõe de mecanismos de reparo aos danos ocasionados. Esses reparos ocorrem durante a fase de replicação, onde as fitas de DNA são desenroladas e utilizadas como moldes a partir das sequências dos genes dispostos ao longo da cadeia complementar para a codificação¹⁴.

Se durante o mecanismo de reparo, as cromátides-irmãs não estiverem disponíveis durante o ciclo celular como molde para a correta recomposição das fitas danificadas e a retirada da porção de DNA que foi danificada, o reparo pode ser comprometido, o que se torna relevante devido às modificações permanentes ao DNA que podem ocorrer eventualmente em sítios relacionados à carcinogênese e DCVs¹⁴.

Diante disso, um dos testes que tem sido amplamente utilizado para a detecção de danos no DNA é o ensaio do cometa capaz de detectar danos relacionados a lesões genômicas decorrentes de quebras de fita simples, quebras de fita dupla, eventos de reparo por excisão de bases incompletas, *crosslinks* DNA-DNA, *crosslinks* DNA-proteínas, e formação de sítios álcali-lábeis²⁹.

Assim, detecção e quantificação desses danos em pacientes com risco cardiovascular, possibilitaria a implementação de medidas de prevenção dos fatores de risco e complicações dessas doenças. Essas informações beneficiariam aos profissionais nutricionistas para intervenção e correção de erros alimentares dos indivíduos com danos celulares, com uma intervenção precoce e preventiva para doenças cardiovasculares a nível molecular.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o dano oxidativo basal no DNA de indivíduos com risco cardiovascular com e sem excesso de peso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar os indivíduos segundo variáveis socioeconômicas e estilo de vida;
- Avaliar o estado nutricional da amostra;
- Identificar o dano oxidativo basal no DNA de linfócitos dos indivíduos com e sem excesso de peso;
- Comparar o dano oxidativo basal de indivíduos com e sem excesso de peso.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO E LOCAL DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de corte transversal analítico, a partir da amostra não probabilística, desenvolvido na cidade de Cuiabá, capital do estado de Mato Grosso, mais precisamente na Coordenação de Assistência Social e Saúde do Servidor (CASS), do Campus da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), com voluntários da pesquisa em andamento intitulada: “*Efeito da intervenção nutricional com antioxidantes sobre o dano oxidativo no DNA em células de indivíduos com risco de doenças cardiovasculares*”.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo planejado respeitou todos os aspectos éticos previstos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, com aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Júlio Müller – UFMT, CAAE: 62782716.2.0000.5541.

Os participantes foram esclarecidos e devidamente conscientizados quanto à possibilidade de abandonar o estudo a qualquer momento que desejasse e/ou quando o pesquisador encontrasse alguma condição médica que não aconselhasse a continuidade da participação, assim como, a segurança e sigilo em relação às informações pessoais a serem coletadas e outros dados da pesquisa.

3.3 SUJEITOS DA PESQUISA

A população alvo do estudo foi composta por indivíduos adultos de ambos os sexos, com idade entre 20 e 59 anos, com risco cardiovascular e Índice de massa corporal (IMC) entre 18,5 a 39,9 kg/m², aptos e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndie I).

Foram incluídos no estudo indivíduos adultos de ambos os sexos, com idade entre 20 e 59 anos com risco cardiovascular (dislipidemia, hipertensão arterial e

obesidade); com Índice de Massa Corporal (IMC) entre 18,5 a 39,9 kg/m²; aptos e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram excluídos da amostra indivíduos que apresentavam doenças autoimune, neoplasias; que seguiam dietas da moda (dieta vegetariana, jejum intermitente, dieta atkins, etc.); faziam uso de polivitamínicos nos últimos 6 meses; tabagista, gastroplastiados; gestantes ou lactantes e indivíduos expostos a radiação como raio x, tomografia e ressonância magnética nos últimos dois meses. Esses pacientes foram excluídos ao responderem tais perguntas por meio do questionário de exposição a mutagênicos (Anexo I).

3.4 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

Considerou-se neste estudo dados antropométricos de peso, altura, índice de massa corporal (IMC), circunferência de cintura (CC), circunferência de quadril (CQ), relação cintura-quadril (RCQ). Dados secundários foram coletados das fichas individualizadas e dos prontuários preenchidos pela equipe do projeto principal tais como: idade, sexo, atividade física, tabagismo e etilismo (Apêndice II)

Para avaliação antropométrica foram utilizados os seguintes dados: peso (kg) mensurado em balança digital Toledo devidamente calibrada com capacidade para 150kg e a altura (m), coletada com auxílio de estadiômetro da marca Sanny com capacidade de medição até 2,10m. O IMC foi calculado através da relação do peso (Kg) dividido pela altura² (m) desenvolvido por Lambert Quélet no fim do século XIX, preconizado pela OMS⁹.

A RCQ foi calculada por meio da fórmula: circunferência de cintura (cm) /circunferência de quadril (cm), utilizando os pontos de corte definidos pela OMS⁹ para classificação, sendo que medidas de RCQ igual ou superior a 0,94 em homens e 0,80 em mulheres indica risco de doenças cardiovasculares. Para aferição da CC foi utilizado fita inelástica da marca Sanny com capacidade de até 150cm e graduação de 0,5cm, aferindo no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca e para a circunferência de quadril seguiu-se o protocolo de Callaway³⁰.

3.5 DETERMINAÇÃO DO DANO OXIDATIVO NO DNA

O dano oxidativo basal no DNA foi determinado por meio do ensaio do cometa de acordo a metodologia descrita por Singh²⁹, modificada com a enzima formamidopirimidina glicosilase (FPG) para detecção de dano oxidativo no DNA³¹.

Utilizou-se uma alíquota de 15 µL de sangue total heparinizado da mesma amostra do sangue que foi coletado para as dosagens bioquímicas do projeto principal. A amostra de sangue foi homogeneizada com 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% (Agargen® *low melting*) e distribuídas em lâminas (Knittel, Alemanha) em duplicatas para tratamento com FPG (FPG+) e em duplicata para sem FPG (FPG-), previamente preparadas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%). Após a polimerização da agarose LM a 4°C, as lâminas foram imersas em solução de lise (NaCl 2,5 M, Na₂ EDTA 100mM, Tris 10mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH= 10,0), por no mínimo 24 horas a 4°C.

Após esse período, lavou-se as lâminas com PBS 1x por 5 min, sendo posteriormente mantidas em tampão F (HEPES mM 40; KCl 0,1 M; EDTA 0,5 mM; 0,2 mg/mL, pH= 8) por 10 minutos. Para a detecção dos danos, as células foram tratadas com 50µL da enzima Fpg (0,05 U) (New England Bio Labs Inc., Ipswich, MA, EUA) e incubadas em câmara úmida por 25 minutos a 37°C. Em seguida, incubou-se as lâminas em solução tampão de eletroforese (NaOH 0,3 M e Na₂ EDTA 100mM, pH> 13), onde foram mantidas durante 25 minutos para desenrolamento do DNA e expressão das quebras de fita única e sítios álcali-lábeis. Em seguida, as lâminas foram submetidas a eletroforese à 4°C durante 30 min, com intensidade de corrente de 0,1V/cm (25V/300mA). Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas com tampão de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos e fixadas em etanol absoluto por 5 minutos.

Posteriormente, corou-se as lâminas no momento da análise com Syber Gold (1µL Syber Gold Nucleic Acid Gel Stain 10,000X, Invitrogen, USA, e 30ml de solução TE – Tris-HCl 50mM). Um total de 100 imagens de nucleóides foram capturadas e analisadas aleatoriamente em microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse Ci ProRes MF) em filtro 516-560nm, barreira de filtro de 590nm (aumento total de 400x). O parâmetro escolhido para avaliar as lesões foi o % de DNA na cauda. O dano oxidativo no DNA foi obtido pela diferença entre a % de DNA na cauda na presença (FPG+) e na ausência da enzima (FPG-).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as informações obtidas foram registradas em um banco de dados no *software* Microsoft Excel 2013 e analisadas no *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20.0 (Inc, Chicago, IL, USA). Os resultados foram apresentados em forma de média, desvio padrão e erro padrão.

Foi utilizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* a 5% de significância para verificar a distribuição dos dados. Para as comparações entre grupos (indivíduos com e sem excesso de peso) utilizou-se o teste *Mann-Whitney U*. Foi considerado o nível de significância estatística $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população estudada foi composta por 40 indivíduos, com risco cardiovascular, de ambos os sexos, com idade média de $41 \pm 9,2$ anos, sendo 50% (n=20) do sexo masculino e 50% (n=20) do sexo feminino. O estilo de vida não-sedentária foi relatado por 50% da amostra (n=20), caracterizado por prática de atividade física regular, exercícios aeróbicos como caminhada e corrida ou atividades anaeróbicas como musculação, no mínimo 3 vezes por semana. Com relação ao consumo de bebidas alcoólicas, 72,5% (n=29) relataram consumo habitual aos finais de semana com predominância para o sexo feminino (80%), sem história de tabagismos em 92,5% (n=37) e ex-tabagistas em 7,5% da amostra (Figura 1).

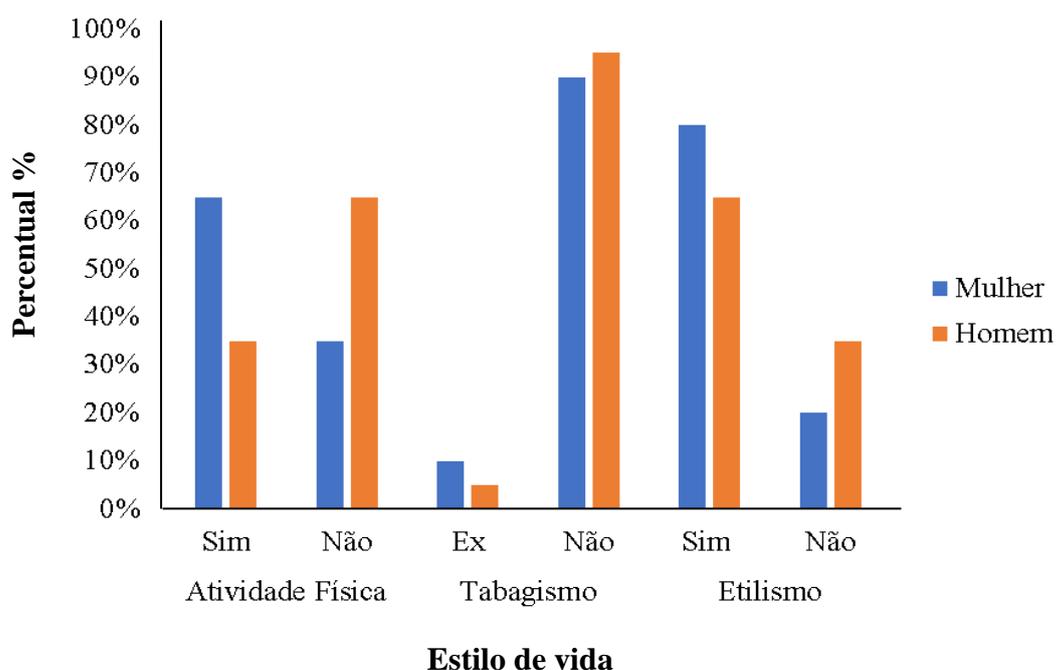


Figura 1. Caracterização dos hábitos de vida de indivíduos com risco cardiovascular, segundo atividade física, tabagismo e etilismo, Cuiabá-MT, 2019.

Hábitos de vida não saudáveis como sedentarismo, uso de tabaco e consumo excessivo de bebidas alcólicas são apontados como fatores de risco modificáveis, importantes para o aparecimento de doenças cardiovasculares na população. Outros

comportamentos de risco intermediário como pressão arterial elevada, glicemia alta, hiperlipidemia, sobrepeso e obesidade quando combinados aos citados acima aumentam as chances de ataques cardíacos e acidentes vasculares encefálicos causados principalmente por depósitos de gorduras nas paredes dos vasos sanguíneos^{1,4}.

Dados do Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), destaca o sedentarismo, uso de tabaco e consumo excessivo de álcool como fator de risco para a doença. Em Cuiabá a frequência de adultos sedentários foi de 46,5%, de tabagistas foi 8,3%, enquanto 36,2% fazem consumo abusivo de álcool⁷. Esse pequeno conjunto de fatores de risco corresponde pela maioria das mortes por doenças crônicas não transmissíveis, incluindo patologias resultante dessas doenças, como a doença coronariana e acidentes cerebrovasculares³².

Dentro do presente estudo, todos os participantes apresentaram pelo menos um fator de risco para doença cardiovascular. Entretanto, dentre esses fatores, o mais predominante na população estudada foi o excesso de peso segundo o IMC ($\text{IMC} \geq 25\text{kg/m}^2$) em 80% da população.

Os índices de massa corporal na amostra estudada variaram entre 20,1 kg/m^2 e 37,1 kg/m^2 , com IMC médio de 31,5 kg/m^2 , em ambos os sexos. A predominância de sobrepeso e obesidade esteve presente em 80% dos indivíduos (30% e 50% respectivamente), com prevalência em ambos os sexos e apenas 20% apresentaram peso adequado.

O excesso de peso está estreitamente associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCVs), sendo que este é destacado como um dos fatores de risco pela Diretriz da *World Heart Federation*. Trata-se de um problema crescente em diversos países, incluindo o Brasil³³. Encontramos no nosso estudo uma frequência elevada de excesso de peso (80%) e conseqüentemente maior risco para doenças cardiovasculares. Entretanto, dentre os 20% que não apresentaram esse fator de risco para doenças cardiovasculares, denotaram algum outro fator de risco para DCVs, como hipertensão e dislipidemia.

Um estudo avaliando a prevalência de excesso de peso em indivíduos com risco de doenças cardiovasculares demonstrou que quanto maior o grau de obesidade e RCQ aumentada dos pacientes, maior a prevalência de hipertensão. Outro destaca maior risco de hipertensão, diabetes melitus e dislipidemias em pacientes com excesso de gordura corporal^{34,35}. Recentemente Dammero³⁶, avaliou o perfil nutricional de pacientes

cardiovasculares e mostrou que 93% encontravam-se com sobrepeso e alta prevalência de sedentarismo.

Essa situação nutricional é definida por fatores sociais, comportamentais, ambientais, culturais, psicológicos, metabólicos e genéticos. Os fatores genéticos desempenham papel importante na determinação da suscetibilidade do indivíduo para o ganho de peso, porém são os fatores ambientais e estilo de vida, tais como hábitos alimentares inadequados e sedentarismo, que geralmente levam a um balanço energético positivo, favorecendo a progressão para obesidade^{37,38}.

Nossos resultados demonstram valores de RCQ aumentada no grupo com excesso de peso quando comparado ao grupo sem excesso de peso ($p=0,007$), com uma razão média de 0,87 no 1º grupo. Quando separados por sexo, os homens do grupo com excesso de peso apresentam valores semelhantes ao preconizado pela OMS9, onde a RCQ igual ou superior a 0,94 em homens e 0,80 em mulheres indica risco de doenças cardiovasculares. A média da RCQ 0,91 entre eles e entre as mulheres de 0,81. Dessa forma, as mulheres do grupo apresentaram maior risco para as DCVs (Tabela 3).

Tabela 3. Características antropométricas de indivíduos com risco cardiovascular, com e sem excesso de peso, segundo o IMC, Cuiabá -MT, 2019.

Variáveis	Sem excesso de peso	Com excesso de peso	Valor de p*
	(n=8) Média±DP	(n=32) Média±DP	
Idade (anos)	41,75±9,96	41,09±9,15	0,919
IMC (kg/m ²)	22,72±1,81	30,88±3,55	0,000
CC (cm)	74,45±8,51	97,01±8,65	0,000
CQ (cm)	96,07±2,15	110,80±10,13	0,000
RCQ	0,77±0,09	0,87±0,07	0,007

IMC Índice de massa corporal; C abd – Circunferência abdominal; CC – circunferência de cintura; CQ – Circunferência de IMC quadril; RCQ – relação cintura/quadril; DP – Desvio padrão; * valor de p significância < 0,05

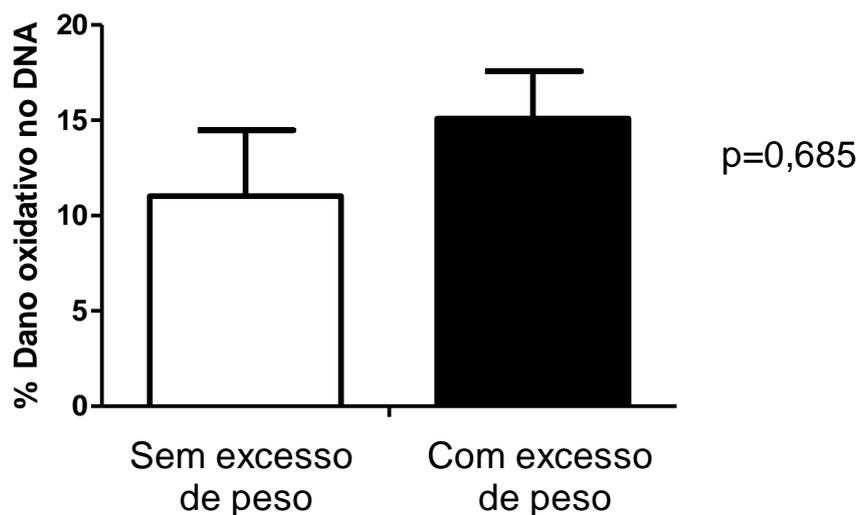
Nossos resultados demonstram valores de RCQ aumentada no grupo com excesso de peso quando comparado ao grupo sem excesso de peso ($p=0,007$), com razão média de 0,87 no primeiro grupo. Quando separados por sexo, os homens do

grupo com excesso de peso apresentam valores semelhantes ao preconizado pela OMS, sendo a média da RCQ 0,91 entre eles e entre as mulheres de 0,81. Segundo a OMS⁹, a medida de RCQ igual ou superior a 0,94 em homens e 0,80 em mulheres indica risco de doenças cardiovasculares. Dessa forma as mulheres do grupo apresentaram maior risco para as DCVs.

É sabido que o excesso de peso e obesidade está associado a inúmeras doenças crônicas, entre elas diabetes mellitus, hiperlipidemia, câncer de cólon, hipertensão arterial sistêmica e outras doenças cardiovasculares. Além disso, a doença também está relacionada ao aumento de cargas mecânicas e metabólicas no miocárdio, que intensifica assim o consumo de oxigênio. Essa sobrecarga ativa a produção de EROs, como o superóxido, o radical hidróxi e os peróxidos de hidrogênio devido ao aumento da respiração mitocondrial^{10,11,12}.

Esse fator induz a ativação do processo inflamatório nesses indivíduos, devido excesso de tecido adiposo, o que está diretamente associado ao aumento do estresse oxidativo. A presença aumentada de adipócitos está relacionada a anormalidades funcionais e estruturais deste tecido. Estas alterações incluem aumento da produção de moléculas bioativas e infiltração aumentada de macrófagos pela liberação da leptina que induz a síntese de óxido nítrico sintetase 2, aumentando assim a produção de citocinas pró-inflamatórias e ativando as espécies reativas de oxigênio que predispõe a célula à danos em estruturas celulares, proteínas, lipídeos e macromoléculas como o DNA^{10,11}.

Ao analisarmos o % de dano no DNA pelo ensaio do cometa, identificamos no presente estudo, maior frequência no grupo com excesso de peso (15,09 %) quando comparado ao grupo sem excesso de peso (11,02%), entretanto, esses valores não foram significativos estatisticamente ($p=0,685$), como demonstra a Figura 3.



*Cálculos considerando média e erro padrão.

Figura 3. Percentual de dano oxidativo no DNA em pacientes com risco cardiovascular, segundo classificação de peso por IMC, Cuiabá-MT, 2019.

Entretanto, quando comparado o % dano no DNA dos indivíduos com excesso de peso que obtiveram média $15,09 \pm 3,3$, é possível notar um nível muito elevado em relação a um grupo controle saudável (dados não publicados no Laboratório de Investigação da Faculdade de Medicina - UFMT) que apresentou média de $4,49 \pm 2,55$ DP. Essa diferença demonstra alta probabilidade desses indivíduos obterem complicações decorrentes desses danos.

Alguns modelos experimentais de obesidade no estudo de Pausova¹⁰, mostraram forte correlação entre adiposidade e marcadores do estresse oxidativo sistêmico, eles apresentaram uniformidade nos resultados e apontam o excesso de peso como fator de risco aumentado para dano oxidativo no DNA. Entretanto nossos resultados não observaram relação entre o excesso de peso e o dano oxidativo, o que poderia ser justificado pelo n amostral reduzido e outros fatores de risco para DCVs que não foram analisados na amostra, como fatores de estilo de vida e exposições externas, como foi analisado no estudo de Muller³⁹.

A diferença não significativa do % de dano oxidativo no DNA entre os grupos com e sem excesso de peso desse estudo, pode estar relacionada ao fator idade dos indivíduos, visto que, não apresentaram diferença significativa entre os grupos ($p=0,919$), sendo a média de 41 anos para ambos. Embora alguns estudos demonstrem que idade e sexo tem relação com o aumento do dano oxidativo no DNA, outros

afirmam que as diferentes exposições ambientais, independente do estado nutricional do indivíduo, idade e sexo, podem aumentar o nível de dano ao DNA, ^{39,40}.

Entretanto, quando comparado nossos resultados a estudos monitorados em cultura de células humanas os dados são conflitantes. Pois, em estudos in vivo com humanos a relação do excesso de gordura corporal sobre dano oxidativo no DNA não demonstra majoritariamente os mesmos resultados encontrados em células in vitro e modelos experimentais com animais. Essa diferença pode estar relacionada aos desenhos de estudos heterogêneos e possíveis fatores de confusão como, por exemplo, dieta definida (em estudos com animais) e, ingestão descontrolada de antioxidantes em humanos⁴¹.

Como objetivo de eficácia de prevenção desses danos, vale destacar as descobertas de Moller^{42,43}, que avaliou alguns estudos de intervenção com antioxidantes nutricionais e produtos ricos em polifenóis e carotenoides sobre a redução das taxas de dano no DNA, bem como ação do sistema de reparo e notou que em geral, essas intervenções possuem efeitos protetores sobre a oxidação do DNA, tanto em indivíduos saudáveis quanto naqueles com altos níveis de dano oxidativo no DNA. Recentemente, um estudo avaliou a eficácia dos antioxidantes em células germinativas de pacientes com diabetes e demonstrou redução dos marcadores de estresse oxidativo e aumento das enzimas antioxidantes⁴⁴.

5.CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da alta prevalência de sobrepeso e obesidade da presente amostra estudada, não encontramos diferenças significativas de dano oxidativo no DNA nos grupos com e sem excesso de peso, ou seja, neste estudo o excesso de peso não influenciou a ocorrência de dano oxidativo no DNA na amostra analisada.

Contudo, é primordial que estratégias de tratamento sejam aplicadas, visando reduzir os níveis de EROs e os danos oxidativos no DNA de indivíduos com risco cardiovascular, com intuito de manter a função celular normal. Isso implica em medidas de prevenção e intervenção com antioxidantes nutricionais, possibilitando inclusive a prevenção do desenvolvimento e complicações e de DCVs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization, WHO. Doenças cardiovasculares. 2017. Disponível em: >>https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=839<<. Acesso em 14 de novembro de 2018.
2. Sociedade Brasileira de Cardiologia SBC. Cardiômetro. 2018. Disponível em: <http://www.cardiometro.com.br/>. Acesso em 21 de dezembro de 2018.
3. Van Eyken EBB, Moraes CL. Prevalência de fatores de risco para doenças cardiovasculares entre homens de uma população urbana do Sudeste do Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro Jan. 2009; 25(1):111-123.
4. Brito BB, Leal JDV, Formiga LMF, Frota KMG, Silva ARV, Lima LHO. Doenças cardiovasculares: fatores de risco em adolescentes. Cogitare Enferm. 2016; 21(2): 01-08.
5. World Health Organization. Obesity and overweight– Disponível em: <<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>>>. Acesso em 20 de janeiro de 2018.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 160p.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Vigitel Brasil 2017: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2017. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 130p.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Inquérito domiciliar sobre comportamentos de risco e morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis: Brasil, 15 capitais e Distrito Federal, 2002-2003. Rio de Janeiro: INCA, 2004.
9. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation. Geneva: World Health Organization, 2000. p. 256. WHO Obesity Technical Report Series, n. 284.
10. Pausova Z. From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. Current Opinion in Nephrology and Hypertension. 2006;15:173-178.
11. Prado *et al.* Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício. Rev Bras Med Esporte. 2009;15(5).
12. França *et al.* Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. J Port Gastreterol. 2013;20(5):199-206.
13. Medeiros GS. Avaliação de marcadores de estresse oxidativo e de índices de dano ao dna em amostras de sangue periférico de pacientes em crise cirrótica atendidos na emergência do hospital universitário da universidade federal de santa Catarina. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2017.
14. Lodish, Harvey *et al.* Biologia celular e molecular. 7. ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.
15. Mondal NK, Sorensen E, Hiivala N, Feller E, Griffith B, Wu ZJ. Oxidative Stress, DNA Damage and Repair in Heart Failure Patients after Implantation of Continuous Flow Left Ventricular Assist Devices. Int J Med Sci. 2013;10(7): 883–93.

16. Barbosa et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr., Campinas*. 2010; 23(4):629-643.
17. Azqueta A, Shaposhnikov S, Collins AR. DNA oxidation: Investigating its key role in DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay, *Mutation Research*. 2009; 674:101–108.
18. Shawki, Shereen M. et al. Increased DNA Damage in Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. *Dna And Cell Biology*, [s.l.], v. 33, n. 12, p.884-890, dez. 2014
19. Bautista-Niño PK, Portilla-Fernandez E, Vaughan DE, Danser AH, Roks AJ. DNA Damage: A Main Determinant of Vascular Aging. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5).
20. Rosello-Lleti E, de Burgos FG, Morillas P, Cortes R, Martinez-Dolz L, Almenar L, Grigorian L, Orosa P, Portoles M, Bertomeu V, and Rivera M. Impact of cardiovascular risk factors and inflammatory status on urinary 8-OHdG in essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2012;(25): 236–42.
21. Rozalski R, Migdalski A, Gackowski D, Guz J, Siomek A, Foksinski M, Szpila A, Zarakowska E, Majer M, Jawien A, and Olinski R. Does morphology of carotid plaque depend on patient's oxidative stress? *Clin Biochem*. 2013;(46):1030–5.
22. Di Minno A, Turnu L, Porro B, Squellerio I, Cavalca V, Tremoli E, Di Minno MN. 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine Levels and Cardiovascular Disease: A Systematic review and Meta-Analysis of the Literature. *Antioxid Redox Signal*. 2016;24(10):548-55.
23. Di Minno A, Turnu L, Porro B, Squellerio I, Cavalca V, Tremoli E, Di Minno MN. 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine levels and heart failure: A systematic review and meta-analysis of the literature. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017;27(3):201-08.
24. Renz SV. Oxidação e antioxidantes. Seminário apresentado na Disciplina de Bioquímica do Tecido Animal, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS. p. 1-11. 2003. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/oxid_antiox.pdf>>. Acessado em 03 de fevereiro de 2017.
25. Vasconcelos TB, Cardoso AR, Josino JB, Macena RH, Bastos VP. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? *UNOPAR Cient Cienc Biol Saude*. 2014;16(3):213-9.
26. Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr* 1999;12(2):123-30.
27. Sorensen M, Raaschou-Nielsen O, Brasch-Andersen C, Tjønneland A, Overvad K, Autrup H. Interactions between GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms and smoking and intake of fruit and vegetables in relation to lung cancer. *Lung Cancer*. 2007;55(2):137-44.
29. Singh N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res*. 1988;175:184-91.
30. Callaway CW, Chumlea WC, Bouchard C, Himes JH, Lohman TG, Martin AD, et al. Circumferences. In: Lohman TG, Roche AF, Martorell R, editors. *Anthropometric standardization reference manual*. Champaign: Human Kinetics Books. 1991;44-5.
31. Collins AR, El Yamani N, Lorenzo Y, Shaposhnikov S, Brunborg G, Azqueta A. Controlling variation in the comet assay. *Front Genet*. 2014;20:5-359.
32. World Health Organization. *Global status report on noncommunicable diseases 2014*. Geneva: World Health Organization, 2014.
33. Oliveira LPM, Assis AMO, da Silva MCM, de Santana MLP, dos Santos NS, Pinheiro SMC, et al. Fatores associados a excesso de peso e concentração de gordura abdominal em adultos na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 2009;25(3):570-582.

34. Carneiro C et al. Influência da distribuição da gordura corporal sobre a prevalência de hipertensão arterial e outros fatores de risco cardiovascular em indivíduos obesos. *Rev Assoc Med Bras* 2003; 49(3): 306-11.
36. Dammero DR et al. Perfil e estado nutricional de pacientes hipertensos atendidos em um ambulatório de nutrição do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, São Paulo. 2019;13(77):54-60.
37. Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *International Journal of Obesity*. 2002(26):1159–64.
38. Malta DC, Bernal RTI, Lima MG, Araújo SSC, Silva MMA, Freitas MIF et al. Doenças crônicas não transmissíveis e a utilização de serviços de saúde: análise da Pesquisa Nacional de Saúde no Brasil. *Rev Saúde Pública*. 2017(1);51
39. Møller P. Effect of age and sex on the level of DNA strand breaks and oxidatively damaged DNA in human blood cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2019; 838:16-21.
40. Møller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H. The comet assay as a rapid screen test in biomonitoring occupational exposure and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9:1005–15.
41. Setayesh T, Nersesyan A, Misirlik M, Ferk F, Langie S, Andrade VM, Haslberger A, Knasmüller S, Impact of obesity and overweight on DNA stability: Few facts and many hypotheses, *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*. 2018;777:64-91
42. Møller P, Loft S. Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2002;76(2):303–310.
43. Møller P, Loft S. Interventions with antioxidants and nutrients in relation to oxidative DNA damage and repair. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2004;551(1;2):79-89.
44. Laleethambika N, Anila V, Manojkumar C, Muruganandam I, Giridharan B, Ravimanickam T, Balachanda V. Diabetes and Sperm DNA Damage: Efficacy of Antioxidant. *SN Comprehensive Clinical Medicine*. 2019;1(1):49–59.

ANEXOS E APÊNDICES

Anexo I

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS – EXPOSIÇÃO A MUTAGÊNICOS

Nome: _____ Código no projeto: _____

E-mail: _____ telefone: _____

Data de nascimento: ____/____/____ . Sexo: () Masculino () Feminino

1. Qual o seu trabalho atual? _____
2. Há quanto tempo você exerce essa função? _____
3. Qual a sua jornada de trabalho semanal? _____
4. Quantas horas de sono em média por dia? _____
5. No seu trabalho atual já se expôs a alguma dessas substâncias?
() derivados do petróleo (horas/semana: _____)
() tintas/corantes (horas/semana: _____)
() solventes (horas/semana: _____)
() pesticidas/herbicidas (horas/semana: _____)
() mercúrio/vapores de outros metais pesados (horas/semana: _____)
() outras substâncias químicas – quais? _____ (horas/semana: _____)
6. Qual era o seu emprego anterior / que função exercia? _____
7. No seu emprego anterior, já se expôs a alguma dessas substâncias? (Informe tempo de exposição em horas/semana):
() derivados do petróleo (horas/semana: _____)
() tintas/corantes (horas/semana: _____)
() solventes (horas/semana: _____)
() pesticidas/herbicidas (horas/semana: _____)
() mercúrio/vapores de outros metais pesados (horas/semana: _____)
() outras substâncias químicas – quais? _____ (horas/semana: _____)
8. Você utiliza equipamento de segurança em seu trabalho? Com qual frequência?
() sim () não () / () sempre () quase sempre () pouco
9. Você pratica algum exercício físico? () sim () não
Se sim, qual?
() musculação () corrida () pilates () futebol/vôlei () outro: _____
- Qual a frequência?
() 1 vez /semana () 2 vezes/semana () três vezes/semana () 4 vezes/ semana ou mais
10. Você fuma ou já fumou? () sim () não
Se sim, quantos cigarros fuma por dia e há quanto tempo? _____ (nº de cigarros); _ () meses / () anos

Fuma também: () cigarro de palha () cachimbo () outros:

_____ Quantas vezes ao dia? _____

Se parou, durante quanto tempo você fumou? _____ () meses / () anos

Quantos cigarros fumava por dia? _____ (número de cigarros)

11. Medicamentos utilizados rotineiramente (indicar a frequência em vezes/dia):

() hormônios _____

() vitaminas e/ou suplementos _____

() comprimidos para pressão _____

() antibióticos _____

() insulina _____

() tranquilizantes _____

() relaxantes musculares _____

() outros – quais? _____

12. Está fazendo algum tratamento de saúde? (por ex: coluna, gripe, alergia, dores, etc...)

() sim () não. Qual? _____ Tempo do tratamento:

13. Fez algum raio-X no último ano? () sim () não – Quanto tempo? _____

14. Com que frequência você consome bebidas alcoólicas?

() nunca – vá para a questão 40 () uma vez por mês ou menos () 2 a 4 vezes ao mês

() 2 a 3 vezes por semana () 4 ou mais vezes por semana

15. Quais bebidas você consome?

() somente cerveja () somente vinho () somente destilados () cerveja e vinho

() cerveja e destilados () vinho e destilados () cerveja, vinho e destilados

16. Nas ocasiões em que bebe, quantos doses (), copos () ou garrafas () você costuma tomar?

() 1 ou 2 () 3 ou 4 () 5 ou 6 () 7 a 9 () 10 ou mais

17. Com que frequência você toma seis ou mais doses em uma ocasião?

() nunca () menos que uma vez ao mês () uma vez ao mês

() uma vez por semana () todos os dias ou quase todos

18. Você já teve/tem alguma dessas doenças?

() câncer – Qual? _____ Idade: _____

() AIDS () anemias () doenças cardíacas – Idade: _____ () esclerose

múltipla – Idade: _____ () diabetes – Idade: _____ () outras – quais e que idade apresentou? _____

19. Alguém da sua família já teve/tem alguma dessas doenças? (indicar o grau de parentesco ao lado):

() doenças cardíacas _____ () esclerose múltipla _____ () diabetes _____ Em que idade? _____ () outras – quais?

Casos de câncer na família: () não () sim

20. Quais os tipos de câncer? (indicar o grau de parentesco ao lado):

() pele: _____ () mama: _____ () leucemia: _____ () esôfago: _____ () outros: _____

21. Tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou doença hereditária que afetem seus pais, irmãos, irmãs ou cônjuges?

() não () sim – qual? _____

22. Você e seu cônjuge já tiveram dificuldades em conceber (mais de doze meses) ou já foram diagnosticados como estéreis?

() não () sim

23. Histórico de aborto espontâneo?

() não () sim – quantas vezes?

24. Histórico de bebê com defeitos?

() não () sim – qual?

25. Toma sol por quanto tempo por dia?

26. Nos finais de semana tem o hábito de tomar sol?

() não () sim – Por quanto tempo?

27. Na última semana quanto tempo tomou sol? (em horas ou min.) _____

Assinatura do entrevistado: _____

Data e assinatura do pesquisador responsável: _____

Apêndice I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa denominado **“Efeito da intervenção nutricional com antioxidantes sobre o dano oxidativo no DNA em células de indivíduos com risco de doenças cardiovasculares”** que será desenvolvido na Coordenação de Assistência à Saúde do Servidor (CASS) e no Laboratório de Investigação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Esse projeto está sob a coordenação das professoras Sílvia Regina de Lima Reis (coordenadora geral) e Carmen Lucia Bassi Branco (co-coordenadora), sendo que serão desenvolvidos trabalhos científicos relacionados ao tema, vinculados a Faculdade de Nutrição (FANUT) e de Medicina da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT).

Trata-se de um estudo transversal, onde será aplicado questionário de exposição a agentes mutagênicos, questionário de frequência alimentar e posterior coleta de sangue. Com este estudo os pesquisadores identificarão o dano oxidativo no DNA em células de indivíduos adultos com risco de doenças cardiovasculares. Você contribuirá para o fortalecimento dessa pesquisa que poderá, futuramente, beneficiar a comunidade e a instituição, como forma de impacto social, prevenindo ou minimizando danos no DNA e conseqüentemente o surgimento de doenças cardiovasculares.

De modo geral, serão avaliados pacientes em acompanhamento no Programa CARDIO-UFMT ou qualquer outro paciente que atenda os critérios de inclusão, sendo que os exames bioquímicos de rotina serão coletados do prontuário dos pacientes ou solicitados quando necessário. Necessitaremos coletar 10 ml de sangue para verificar o dano no DNA e, esta coleta será realizada por profissional experiente que trabalha na CASS ou de laboratório privado.

Também informamos a você que a avaliação nutricional e dietética, não lhe causará nenhum risco.

Caso a Sr.(a) aceite participar dessa pesquisa, saiba que não haverá remuneração ou gratificação, sendo sua participação totalmente voluntária. Além disso, sua participação será anônima, ou seja, em momento algum os resultados obtidos por meio de seus exames serão divulgados contendo nomes individualizados. Saiba que os

resultados estarão sob a guarda das pesquisadoras responsáveis e arquivados em seu computador pessoal. Os originais de seus exames permanecerão arquivados na CASS ou com você.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome e/ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O Sr.(a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você. Caso haja danos decorrentes dos riscos previstos, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelos mesmos. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Julio Müller – UFMT, pelo telefone (65) 3815-8254 e falar com a Coordenadora Prof^a Dr^a Shirley Fereira. Pereira

Prof. Sílvia Regina de Lima Reis
silviarlima@terra.com.br
Fone: 93615-8856

Apêndice II

Projeto: “Efeito da intervenção nutricional com antioxidantes sobre o dano oxidativo no DNA em células de indivíduos com risco de doenças cardiovasculares”

1. Identificação

Data ____ / ____ / ____

ID: _____

Nome: _____

Email: _____ Telefones

(res./cel.): _____

Setor de trabalho: _____ Ramal: -

Sexo: (1) Masculino (2) Feminino Data de nascimento: ____ / ____ / ____ Idade: _____

Profissão: _____ Estado civil: (1) Solteiro (2) Casado (3) Divorciado (4) Viúvo

Renda/mês: R\$ _____ Nº. pessoas dependentes da renda: _____

Renda per capita: R\$ _____ Faixa de renda: (1) < 2 SM (2) 2 - 3,9 SM
(3) 4 - 5,9 SM (4) 6 - 7,9 SM (5) ≥ 8 SM

2. Doenças atuais? (1) Sim (2) Não. 4.1. Qual (is)? Há quanto tempo? Especificar a frente.

(1) Diabetes Mellitus T1 _____ (2) Diabetes Mellitus T2 . _____ (4) Derrame – AVE
_____ (5) Infarto do Miocárdio _____ (6) Obesidade _____

(7) Hipercolesterolemia _____ (8) Hipertrigliceridemia _____ (9)

Hiperurecemia . _____ (10) Hipotireoidismo _____ (11) Depressão _____ (12)

Câncer _____

(13) Outra: _____

3. Saúde da Mulher

Número de gestações: (1) (2) (3) (4) (5) (≥6) Tipo de parto: () Normal ou ()

Cesárea

(1) Pré-menopausa (2) Pós-menopausa.

TPM: (1) Sim (2) Não Retenção hídrica no período menstrual (1) Sim (2)

Não TRH? (1) Sim (2) Não Realiza há quanto tempo?

4. Usa Medicamentos? (1) Sim (2) Não. 7.1. Qual (is)? Qual a dosagem e posologia?

Especificar:

5. Usa adoçante? (1) Sim (2) Não. 14.1. Qual tipo?

(1) Sacarina (2) Ciclamato (3) Aspartame (4) Stévia (5) Acesulfame-k

Quantidade/mês: ____ N°. pessoas que comem em casa: ____ **14.3. Per capita/dia:**
____ ml

6. Avaliação Antropométrica e Composição Corporal

Parâmetros	Datas	
Peso Habitual (kg)		
Peso Atual (kg)		
% Redução de peso		
% Ganho de peso		
Altura (m)		
IMC atual		
Classificação IMC ¹		
CC (cm)		
CA (cm)		
CQ (cm)		
CP (cm)		
CPant. (cm)		
RCQ		
PCB (mm)		
PCT (mm)		
PCSI (mm)		
PCSE (mm)		

¹ Classificação do IMC: (1) Eutrofia (2) Sobrepeso (3) Obesidade
(4) Baixo Peso

19. Avaliação laboratorial

Parâmetros	Data	
Pressão arterial		
Hemácias		
Hematócrito		
Hemoglobina		
Glicemia de jejum		
Glicemia Pós-prandial		
Hemoglobina glicada		
Triglicerídeos		
Colesterol total		
LDL		
HDL		
VLDL		
TGO/AST		
TGP/ALT		
GGT		
TSH		
T4 Total		
T4 livre		
T3 livre		
T3 reverso		
Creatinina		
Uréia		
Ácido urico		
Risco de DAC (%)		
Classificação Risco ¹		
Síndrome Metabólica ²		
Proteínas totais		
Albumina		
Vitamina D (25 hidroxivitamina D)		
Vitamina B12		
Vitamina A		
Vitamina C		
Vitamina E		
Ácido fólico		
Insulina		
PCR ultrasensível		
Na		
K		
Ca iônico		
Magnésio		
Ferro		

Zinco		
Cobre (ceruloplasmina)		
Fosforo		
Ferritina		
Homocisteína		
Testosterona total		
Testosterona livre		
PTH		
Cortisol		

¹ Classificação Risco DAC:(1) <10% - baixo risco (2) 10-20% - risco intermediário (3) >20% - alto risco

² Presença de Síndrome Metabólica: (1) Sim (2) Não

Assinatura do pesquisador responsável:
