



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIGENOTÓXICOS,
ANTIOXIDANTES E FARMACOLÓGICOS DE EXTRATOS
DA POLPA DO FRUTO DO PEQUI (*Caryocar brasiliense*
CAMB).**

ANA LUISA MIRANDA-VILELA

Brasília/DF

2009



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIGENOTÓXICOS,
ANTIOXIDANTES E FARMACOLÓGICOS DE EXTRATOS
DA POLPA DO FRUTO DO PEQUI (*Caryocar brasiliense*
CAMB).**

Ana Luisa Miranda-Vilela (06/26864)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia

Brasília/DF

2009



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Tese de Doutorado

Ana Luisa Miranda-Vilela

Título:

“Avaliação dos efeitos antigenotóxicos, antioxidantes e farmacológicos de extratos da polpa do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)”

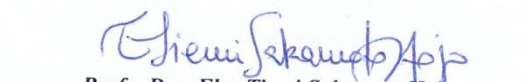
Comissão Examinadora:


Prof. Dr. César Koppe Grisólia
Presidente / Orientador
UnB


Profa. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa
Unb


Prof. Dr. Luzitano Brandão Ferreira
Membro Titular Interno não Vinculado ao Programa
Unb


Profa. Dra. Damaris Silveira
Membro Titular Interno não Vinculado ao Programa
UnB


Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
USP

Profa. Dra. Zulmira Guererro Marques Lacava
Membro Suplente
Interno Vinculado ao Programa
UnB

Brasília, 27 de fevereiro de 2009.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília (UnB), com suporte técnico das empresas Farmacotécnica e Laboratórios Sabin/Núcleo de Apoio a Pesquisa e suporte financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FINATEC (Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos).

A meu pai, Luiz de Gonzaga Miranda,
grande homem cujo exemplo de vida,
comprometimento, dedicação, amor e
carinho sempre me inspiraram e
iluminaram meu caminho (*in memoriam*).

Dedico

*"A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original."*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus e a todo o plano espiritual, pelo dom da vida, força interior, intuições, coincidências e soluções perfeitas e oportunas que me conduziram durante todo o tempo de forma sensacional, especialmente no decorrer do doutorado.

Ao prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia, pela confiança em mim depositada, pela orientação, amizade, atenção e apoio em todos os momentos.

À prof^a Dr^a Inês Sabioni Resck, pela amizade, análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia Gasosa (CG) dos extratos do pequi e apoio técnico na parte de extração e obtenção dos extratos, além da contribuição de extrema importância e relevância na redação e revisão do artigo sobre a química do pequi.

Ao prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves, pela amizade, apoio nas análises estatísticas dos dados e excelentes conselhos que me estimularam a finalizar esta etapa importantíssima da minha vida com um ano de antecedência.

Às professoras Dr^a Maria de Nazaré Klautau-Guimarães e Dr^a Silviene Fabiana de Oliveira, pela amizade, convivência e apoio na parte de Marcadores Moleculares.

À prof^a Dr^a Zulmira Guerrero Marques Lacava, pela amizade, convivência e pela grande ajuda nos processos burocráticos para liberação dos trabalhos executados com os voluntários atletas no decorrer do primeiro semestre de 2008.

Aos Laboratórios Sabin/Núcleo de apoio à pesquisa por todo o apoio técnico que possibilitou a realização deste trabalho, particularmente em nome das Doutoradas Sandra Santana Soares Costa, Janete Ana Ribeiro Vaz e Luciana Naves.

À Farmacotécnica, pelo apoio técnico na produção das cápsulas de pequi, particularmente em nome dos Doutores Rogério Tokarski, Leandra Sá de Lima, Márcia Helena e Luciana.

Ao farmacêutico-bioquímico dos Laboratórios Sabin, Luiz Carlos da Silva Pereira, pelos 10 meses de parceria nos trabalhos com os atletas e à sua esposa, Cíntia Vidal Silva, pela paciência, dedicação e preparo de sanduíches para os atletas.

A toda equipe dos Laboratórios Sabin, pelo cadastramento dos voluntários (particularmente Paula Maestri), coleta de sangue (particularmente Luiz Carlos, Igor Pereira, Dilomar Júnior e Marta Rose) e participação como voluntários atletas.

Aos atletas dos Laboratórios Sabin, em nome de Luiz Carlos da Silva Pereira; ao grupo de dança Eixo, em nome de Maria Emília Cambraia Guimaro Diniz; aos peritos da Polícia Civil do DF, em nome de Gustavo de Carvalho Dalton; à Equipe Quero-quero, em nome de Ednaldo Mesquita Carvalho; aos atletas do Centro Educacional Leonardo da Vinci (alunos, professores e coordenador disciplinar); aos alunos (atletas) da Universidade de Brasília e a todos os demais atletas que participaram deste trabalho, minha eterna gratidão.

À profª Drª Egle Machado de Almeida Siqueira, pela disponibilização do fluorímetro e à profª Drª Sandra Arruda, pelo apoio técnico durante a realização do teste de TBARS.

À profª Drª Gilvânia Feijó, pela ajuda com voluntários e à profª Drª Dulce Dulce Maria Sucena da Rocha, pela prontidão em ajudar.

Aos queridos amigos, colegas e companheiros de trabalho do Laboratório de Genética da UnB, Arthur Kenji Akimoto e Penha Cristina Zaidan Alves, pela grande ajuda nos procedimentos laboratoriais, pelo apoio nos momentos difíceis e por terem transformado os sábados, domingos e feriados de trabalho árduo em momentos de aprendizado, descontração e amizade.

À ex-auxiliar do Laboratório de Genética da UnB, Eliza Januário da Silva, pela participação eficiente e prestativa em todos os experimentos e pelos grandes momentos de descontração.

À Joicy Ferreira de Queiroz, pela amizade, pela substituição extremamente competente nas aulas do Centro Educacional Leonardo da Vinci, me possibilitando cumprir os créditos de diversas disciplinas importantes do doutorado, pelos contatos essenciais com o prof. Carlos Alberto Gonçalves e com o Núcleo de Apoio à pesquisa dos Laboratórios Sabin, pela participação como voluntária-atleta e pela ajuda com voluntários, meu muito obrigado.

À profª Marilene Zorzo e ao restaurante “Coisas da Roça”, em nome de Olímpio e Márcio, pelo fornecimento de pequi em momentos de extrema necessidade.

Ao técnico do Laboratório de Genética da UnB, Orníl Claro Costa, pela amizade e suporte técnico.

À equipe da profª Zulmira Guerrero Marques Lacava, especialmente Flávia Arruda Portilho Corrêa e Luzirlane dos Santos Barbosa, pela ajuda na parte experimental com camundongos.

Aos meus pais – Luiz Miranda e Anna Angélica – que, através da educação, orientação e apoio, forneceram subsídios para meu crescimento pessoal e profissional.

A meu esposo Virgílio e meus filhos Janice e Daniel, pelo carinho, compreensão, companheirismo e grande apoio, inclusive técnico.

À minha mãe, irmãs e sobrinhos, pelo carinho, apoio, amizade e momentos de descontração.

Aos meus parentes afins, pelo apoio técnico e emocional, especialmente Viviane, Virgínia e David.

A minha sobrinha Bruninha, pelos momentos de alegria e descontração.

Aos meus grandes amigos, Marcos César Moraes Ribeiro, Cléo Miguez, Alberto Braga, Jacque, Vicente, Carminha, Cláudia, Wald, Betinha, Serginho, por todo apoio, carinho, momentos de descontração e ajuda nos momentos difíceis.

Ao Dr. Paulo da Cruz de Almeida, pela grande ajuda com artigos e sugestões na parte de proteção cardiovascular deste trabalho.

À minha irmã Jordana, pelo importante contato com o Dr. Paulo.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, pelo incentivo, amizade, ajuda com voluntários e grandes momentos de descontração; obrigada Cassinha, Graciana, Leonora, Bélin, Ricardo, Sandra, Ana Elizabeth, Letícia, Mila, Gustavo, Dudu, Rafaela, Carol, Diana, Ana Arcanjo, Neide, Gabriel, Guilherme, Lane, Flavinha (Portilho), Luciana, Júlia, Danielle (Dani), Débora, Mary Ann, Flávia, Adriana, Neda e demais colegas.

À Estat Consultoria, empresa Júnior do departamento de estatística da UnB, pela grande contribuição nas análises estatísticas dos dados, particularmente em nome de Thiago Freitas Angelo, Igor Ferreira do Nascimento, Gilson Matos, Juliana Labarrère e Lívia Ventura.

À Susan Casement, pela revisão do inglês do abstract do presente trabalho e dos artigos enviados para publicação.

A Douglas Borba e Jussara de A. Serpa, pela revisão do inglês de artigos durante a ausência da Susie (Susan Casement).

À diretora do Instituto de Biologia, Prof^a Dr^a Sônia Nair Bão e aos diretores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, Prof. Dr. Miguel Marini e Prof^a Dr^a Elisabeth Schwartz, pelo empenho e dedicação.

Aos funcionários da Secretaria do Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, Nara Irléia de Siqueira, Thais Gois e Antonio Marcos Melônio, pela eficiência em todos os momentos.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, que através da transmissão de conhecimento forneceram estímulos e subsídios para a continuação da minha carreira acadêmica.

Ao CNPq, pela bolsa concedida, o que me permitiu dedicar exclusivamente ao doutorado e defender a tese com um ano de antecedência.

À FINATEC, pelo apoio financeiro do projeto.

À Administração do Parque da Cidade, em nome de Joseni e Ana, pela liberação para a realização das corridas dos atletas.

Ao Laboratório de Física da UnB, pelo fornecimento de nitrogênio líquido.

À Geni Rodrigues Sampaio, pela ajuda com protocolos e artigos sobre ensaios de atividade antioxidante *in vitro*.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho.

RESUMO

O consumo diário de antioxidantes naturais protege contra danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio (ERO) e pode reduzir o risco de câncer, aterosclerose e outras doenças degenerativas. O treinamento físico induz adaptações benéficas, mas exercícios extenuantes ou com frequência de treinamento muito elevada aumentam a geração de ERO, resultando em danos oxidativos no DNA e nos tecidos. O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é uma fruta típica do Cerrado Brasileiro, bem conhecida na culinária regional e usada na medicina popular para tratar várias enfermidades. Sua polpa contém diversos antioxidantes como carotenóides, vitamina C e compostos fenólicos, e sua composição de ácidos graxos é representada principalmente pelos ácidos oléico (51,37 a 55,87%) e palmítico (35,17 a 46,79%). O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos antígeno-tóxicos, antioxidantes e farmacológicos de extratos da polpa do pequi, através de estudos *in vivo* em camundongos e atletas humanos (corredores de rua). Os testes pré-clínicos e toxicológicos em camundongos mostraram que os extratos não tiveram efeito clastogênico ou genotóxico sobre as células e ambos protegeram os animais contra danos oxidativos no DNA induzidos por bleomicina ou ciclofosfamida, dois fármacos antineoplásicos. Entretanto, o efeito protetor dependeu da dose. O teste de TBARS, usado para avaliar a atividade antioxidante, mostrou que, nas doses testadas, o extrato aquoso elevou a peroxidação lipídica nos camundongos de ambos os sexos, especialmente nos machos; o extrato orgânico aumentou a peroxidação lipídica apenas nos machos, sem efeitos nas fêmeas. O extrato orgânico (óleo de pequi) foi escolhido para investigar os efeitos antioxidantes contra danos oxidativos induzidos pelo exercício em atletas corredores de rua. Para avaliar se os efeitos antioxidantes do óleo de pequi foram influenciados pelos genótipos das enzimas antioxidantes e da haptoglobina (Hp), foram investigados os polimorfismos dos genes Mn-SOD (–Val9Ala), CAT (–21A/T), GPX1 (Pro198Leu) e Hp. As avaliações foram feitas após corridas ao ar livre em terreno plano, antes e depois da ingestão de 400mg de óleo de pequi em cápsulas durante 14 dias. A pressão arterial dos voluntários foi checada antes das corridas. Após as duas corridas, foram colhidas amostras de sangue e essas foram submetidas ao teste do cometa, teste TBARS, hemograma, lipidograma pós-prandial e análises bioquímicas de creatina-fosfoquinase (CPK), transaminase glutâmica-oxalacética (TGO), transaminase glutâmica-pirúvica (TGP), proteína C-reativa ultra-sensível (PCR-US). Os resultados dos testes de TGO, TGP e cometa indicaram influência do sexo, e uma redução significativa de danos após o tratamento com óleo de pequi foi observada no grupo de mulheres para TGO e TGP e em ambos os sexos para o teste do cometa. Para esses marcadores, também houve influência do genótipo Mn-SOD, cuja frequência mais alta de heterozigotos foi relacionada a menores danos no DNA e nos tecidos, além de exibirem melhor resposta ao óleo de pequi. Para CPK e PCR-US, os resultados indicaram que o sexo exerceu efeito significativo, e uma queda não-significativa nos valores foi observada apenas para os homens. No eritrograma, a tendência geral de redução de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito após pequi foi particularmente associada a uma maior expansão do plasma, sendo tais resultados

influenciados por sexo, idade (eritrócitos, hemoglobina) e genótipos de haptoglobina (eritrócitos, hemoglobina e hematócrito), Mn-SOD (hematócrito), CAT (hemoglobina e hematócrito) e GPX1 (hemoglobina). A redução significativa da anisocitose foi relacionada principalmente ao efeito protetor antioxidante do óleo de pequi. Os resultados do leucograma e da série plaquetária sugeriram que o óleo de pequi foi biologicamente eficiente em reduzir a inflamação provocada pelo exercício agudo. Queda significativa nos valores da pressão arterial, de colesterol total e LDL pós-prandiais foram observadas no grupo ≥ 45 anos, sugerindo que o óleo de pequi apresentou efeitos cardiovasculares protetores, principalmente para aqueles atletas incluídos na faixa etária de maior risco. Para os homens, o teste TBARS apresentou resultados contrários àqueles obtidos com camundongos e, novamente, nenhum efeito foi observado nas mulheres. Porém, tais resultados foram influenciados por idade, distância percorrida e genótipos Hp e Mn-SOD. Mediante o apresentado, podemos concluir que o óleo de pequi, além de possuir várias propriedades nutricionais, apresentou efeitos antioxidantes e cardiovasculares protetores e, após testes adicionais e com a definição da dose adequada, também poderá ser usado como adjuvante na quimioterapia do câncer, na forma de suplemento na dieta.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense* Camb.; efeito antígenotóxico; efeito antioxidante; efeito cardioprotetor; teste do cometa; hemograma; índices hematimétricos (VCM, HCM, MHCM e RDW); perfil lipídico pós-prandial; creatina-fosfoquinase (CPK); transaminase glutâmica-oxalacética (TGO); transaminase glutâmica-pirúvica (TGP); proteína C-reativa ultra-sensível (PCR-US); teste de TBARS; polimorfismos dos genes Mn-SOD (–Val9Ala), CAT (–21A/T), GPX1 (Pro198Leu) e haptoglobina.

ABSTRACT

The daily consumption of natural antioxidants protects against oxidative damage caused by reactive oxygen species (ROS) and can reduce the risk of cancer, atherosclerosis and other degenerative diseases. Physical training induces beneficial adaptations, but exhausting exercise above habitual intensity or training increases generation of ROS, resulting in oxidative damages in DNA and in tissues. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) is a typical fruit found in the Brazilian Cerrado (a savanna-like biome), well-known in regional cookery and used in folk medicine to treat various illnesses. Its pulp contains several antioxidant such as carotenoids, vitamin C and phenolic compounds, and its fatty acid composition is represented mainly by oleic (51.37 to 55.87%) and palmitic (35.17 to 46.79%) acids. The aim of this study was to investigate the antigenotoxic, antioxidant and pharmacological effects of pequi fruit pulp extracts through *in vivo* studies in mice and human athletes (street runners). Preclinical and toxicological tests in mice showed that the extracts had no clastogenic or genotoxic effect and both protected mice against oxidative DNA damage induced by bleomycin or cyclophosphamide, two antineoplastic drugs. However, the protective effect depended on the dose. TBARS assay, used to assess the antioxidant activity, showed that, at the tested doses, the aqueous extract enhanced lipid peroxidation in mice of both sexes, especially in males; the organic extract enhanced lipid peroxidation only in males, with no effect in females. Then, we chose the organic extract (pequi oil) to investigate its antioxidant effects against exercise-induced oxidative damages in runners. To estimate if the antioxidant effects of the pequi oil were influenced by antioxidant enzymes and haptoglobin (Hp) genotypes, the Mn-SOD (–Val9Ala), CAT (–21A/T), GPX1 (Pro198Leu) and Hp genes' polymorphisms were investigated. Evaluations took place after outdoor races on flat land before and after ingestion of 400mg pequi-oil capsules for 14 days. The arterial pressure of volunteers was checked before the races. Blood samples were taken after the two races and submitted to comet assay, TBARS assay, blood count (hemogram), postprandial lipid profile dosage and biochemical analyses of creatine phosphokinase (CPK), glutamic-oxalacetic transaminase (GOT), glutamic-pyruvic transaminase (GPT), high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP). Results of GOT, GPT and comet tests indicated influence of sex, and significant damage decrease after pequi oil treatment was observed in the women group for GOT and GPT tests and in both sexes for the comet test. For these markers, there were also influences of Mn-SOD genotype, whose higher frequency of heterozygous was related to lower DNA damage and tissue injuries, besides presenting a better response to the pequi oil. Regarding CPK and hs-CRP, results indicated that sex exerted significant effect, and a non-significant decrease in the values was observed only for men. Results of erythrogram indicated that the general downward trend of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit after treatment was particularly associated to a higher plasma expansion, and they were influenced by sex, age (erythrocytes, hemoglobin) and haptoglobin (erythrocytes, hemoglobin and hematocrit), Mn-SOD (hematocrit), CAT (hemoglobin and hematocrit) and GPX1 (hemoglobin) genotypes. The significant decrease in the anisocytosis was related mainly to the protective antioxidant effect of pequi oil.

Results of leukogram and platelets parameters (platelet count, plateletocrit, mean platelet volume – MPV, platelet deviation weight – PDW) suggested that pequi oil was biologically efficient to reduce the inflammation provoked by acute exercise. Significant decrease in the values of arterial pressure, postprandial total cholesterol and LDL-C was observed in age group ≥ 45 years, suggesting that pequi oil presented protective cardiovascular effects, mainly for those athletes included in the age group of higher risk. For males, TBARS assay presented results contrary to those obtained with mice and, again, no effect was observed in females. However, these results were influenced by age, distance covered, Hp and Mn-SOD genotypes. By means of our results we can conclude that pequi-oil, as well as possessing many other nutritional properties, showed protective antioxidant and cardiovascular effects and, after more tests and with adequate adjustment of the dose, it also could be a useful dietary supplement as adjuvant to the chemotherapy of cancer.

Keywords: *Caryocar brasiliense* Camb.; antigenotoxic effect; antioxidant effect; protective cardiovascular effects; comet assay; hemogram; hematimetric indexes (MCV, MCH, MCHC and RDW); postprandial lipid profile; creatine phosphokinase (CPK), glutamic-oxalacetic transaminase (GOT), glutamic-pyruvic transaminase (GPT), high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP); TBARS assay; Mn-SOD (–Val9Ala), CAT (–21A/T), GPX1 (Pro198Leu) and haptoglobin genes' polymorphisms.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	1
LISTA DE TABELAS.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.)	9
1.2. Radicais Livres (RL)	11
1.3. Sistema de defesa antioxidante.....	12
1.3.1. Sistema enzimático de defesa antioxidante.....	13
1.3.1.1. Superóxido dismutase (SOD)	13
1.3.1.2. Catalase (CAT)	13
1.3.1.3. Sistema Glutathione.....	14
1.3.2. Sistema não-enzimático de defesa antioxidante	14
1.3.2.1. Vitamina E (α -tocoferol)	14
1.3.2.2. Vitamina C (ácido ascórbico).....	15
1.3.2.3. Carotenóides.....	15
1.3.2.4. Haptoglobina (Hp)	16
1.4. Estresse Oxidativo	17
1.5. Exercícios físicos e estresse oxidativo.....	18
1.5.1. Musculatura esquelética e estresse oxidativo.....	20
1.5.2. Miocárdio e estresse oxidativo	21
1.5.3. Fígado e estresse oxidativo	22
1.5.4. Sangue e estresse oxidativo	23
1.5.4.1. Eritrócitos e estresse oxidativo	23
1.5.4.2. Sistema imune e estresse oxidativo.....	24
1.5.4.3. Plasma e estresse oxidativo.....	25
1.5.4.4. Lipoproteínas e estresse oxidativo	26
1.5.5. DNA e estresse oxidativo.....	27
1.6. Polimorfismos genéticos relacionados ao estresse oxidativo	27
1.6.1. Polimorfismos das enzimas antioxidantes.....	27
1.6.1.1. Polimorfismo Val9Ala na sequência-sinal mitocondrial da Mn-SOD (NCBI, refSNP ID: rs1799725)	28
1.6.1.2. Polimorfismo -21A/T na região promotora da CAT (NCBI, refSNP ID: rs7943316).....	29
1.6.1.3. Polimorfismo Pro198Leu da GPX1 (NCBI, refSNP ID: rs1050450).....	29
1.6.2. Polimorfismo da haptoglobina (Hp)	30
1.7. Dieta com antioxidantes contra o estresse oxidativo	31
1.7.1. Antioxidantes contra o estresse oxidativo induzido por exercícios.....	32
2. HIPÓTESE.....	34
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Obtenção do material botânico e dos extratos.....	36

4.1.1. Obtenção do material botânico	36
4.1.2. Obtenção dos extratos	36
4.1.1.1. Verificação do melhor sistema para extração	36
4.1.1.2. Verificação do rendimento-massa	36
4.2. Testes pré-clínicos e toxicológicos em camundongos.....	37
4.2.1. Quimioterápicos	37
4.2.2. Extratos de pequi.....	37
4.2.3. Animais	37
4.2.4. Teste do micronúcleo (MN)	37
4.2.5. Eletroforese em gel de célula única – Teste do Cometa	38
4.2.6. Teste de TBARS.....	39
4.3. Testes com voluntários atletas.....	40
4.3.1. Procedimentos de extração da polpa do pequi e preparação das cápsulas	41
4.3.2. Desenho experimental	41
4.3.3. Coleta de sangue	42
4.3.4. Teste do Cometa	42
4.3.5. Teste de TBARS.....	42
4.3.6. Preparação do sangue para genotipagem da haptoglobina e enzimas antioxidantes	42
4.3.7. Extração de DNA.....	43
4.3.8. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e RFLP (polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição).....	43
4.3.8.1. Genotipagem da Mn-SOD – Polimorfismo Val9Ala na sequência-sinal mitocondrial (NCBI, refSNP ID: rs1799725)	44
4.3.8.2. Genotipagem da CAT – Polimorfismo –21A/T na região promotora (NCBI, refSNP ID: rs7943316)	46
4.3.8.3. Genotipagem da GPX1 – Polimorfismo Pro198Leu (NCBI, refSNP ID: rs1050450)	47
4.3.8.4. Genotipagem da Haptoglobina	48
4.3.9. Dosagens séricas de TGO, TGP e CPK	49
4.3.10. Hemograma	50
4.3.11. Lipidograma	50
4.3.12. Dosagem sérica de PCR-US	50
4.3.13. Análises Estatísticas	50
5. RESULTADOS	52
5.1. Obtenção dos extratos.....	52
5.1.1. Verificação do melhor sistema para extração	52
5.1.2. Verificação do rendimento-massa.....	52
5.2. Testes pré-clínicos e toxicológicos em camundongos.....	53
5.2.1. Teste do micronúcleo (MN)	53
5.2.2. Teste do Cometa	55
5.2.3. Teste de TBARS.....	56
5.3. Testes com voluntários atletas.....	57
5.3.1. Análise dos marcadores genéticos.....	57
5.3.2. Avaliação dos efeitos do óleo de pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.) contra danos oxidativos induzidos pelo exercício	59
5.3.2.1. Dosagens séricas de TGO, TGP e CPK e teste do Cometa.....	59
5.3.2.2. Hemograma.....	69
5.3.2.3. Perfil lipídico pós-prandial	90
5.3.2.4. Teste de TBARS.....	101
5.3.2.5. Pressão arterial e PCR ultra-sensível.....	107
5.3.2.6. Efeitos Colaterais.....	110

5.3.2.7. Aceitação das cápsulas.....	110
6. DISCUSSÃO.....	111
6.1. Testes pré-clínicos e toxicológicos em camundongos.....	111
6.2. Testes com voluntários atletas.....	114
7. CONCLUSÕES.....	130
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	132
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
10. ANEXOS.....	147
10.1. Anexo I – Parecer CONEP.....	147
10.2. Anexo II – Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia Gasosa (CG) dos extratos da polpa do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.)	148
10.3. Anexo III – Artigo.....	153
10.4. Anexo IV – Explicação do Termo de Consentimento	161
10.5. Anexo V – Termo de Consentimento.....	164
10.6. Anexo VI – Questionário	166
10.7. Anexo VII – Valores de referência dos exames realizados nos Laboratórios Sabin.	170

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: DESENHO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DA HP HUMANA.....	17
FIGURA 2 – ANÁLISE DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO <i>NGO MIV</i> NO GENE DA MN-SOD.	45
FIGURA 3 – ANÁLISE DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO <i>HINF I</i> NO GENE DA CAT.....	46
FIGURA 4 – ANÁLISE DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO <i>APA I</i> NO GENE DA GPX1. ...	48
FIGURA 5 – ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA CADEIA α DA HAPTOGLOBINA.	49
FIGURA 6 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NAS DOSAGENS SÉRICAS DE TGO E TGP DO GRUPO TOTAL.....	60
FIGURA 7 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NAS DOSAGENS SÉRICAS DE CPK E NO ÍNDICE DE DANOS NO DNA (ID – TESTE DO COMETA) DO GRUPO TOTAL.....	60
FIGURA 8 – INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DE MN-SOD NAS DOSAGENS SÉRICAS DE TGO E TGP ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.....	68
FIGURA 9 – INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DE MN-SOD NO ÍNDICE DE DANOS NO DNA (ID CONTROLE – TESTE DO COMETA) ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	68
FIGURA 10 – INFLUÊNCIA DOS SUBTIPOS DE HP NA VARIÁVEL HEMÁCIAS ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	82
FIGURA 11 – INFLUÊNCIA DOS SUBTIPOS DE HP NA VARIÁVEL HEMOGLOBINA ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	82
FIGURA 12 – INFLUÊNCIA DOS SUBTIPOS DE HP NA VARIÁVEL HEMATÓCRITO ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	83
FIGURA 13 – INFLUÊNCIA DOS TIPOS DE HP NA VARIÁVEL HEMÁCIAS ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	84
FIGURA 14 – INFLUÊNCIA DOS TIPOS DE HP NA VARIÁVEL HEMATÓCRITO ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	84
FIGURA 15 – INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DE MN-SOD NA VARIÁVEL HEMATÓCRITO. .	85
FIGURA 16 – INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DE CAT NA VARIÁVEL HEMÁCIAS ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	86
FIGURA 17 – INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DE CAT NA VARIÁVEL HEMATÓCRITO ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	86
FIGURA 18 – INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DE CAT NA VARIÁVEL VCM ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	87

FIGURA 19 – INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DE CAT NA VARIÁVEL HCM ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	87
FIGURA 20 – INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DE GPX1 NA VARIÁVEL HEMOGLOBINA ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	88
FIGURA 21 – INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DE GPX1 NA VARIÁVEL VCM ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	89
FIGURA 22 – INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DE GPX1 NA VARIÁVEL HCM ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	89
FIGURA 23 – INFLUÊNCIA DOS SUBTIPOS DE HP NA VARIÁVEL HDL ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	99
FIGURA 24 – INFLUÊNCIA DOS TIPOS DE HP NA VARIÁVEL HDL ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	100
FIGURA 25 – INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS CAT NA VARIÁVEL HDL ANTES E DEPOIS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	101
FIGURA 26 – RESULTADOS DO TESTE DE TBARS PARA O GRUPO TOTAL E POR SEXO ANTES E APÓS A SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	102
FIGURA 27 – RESULTADOS DO TESTE DE TBARS POR FAIXA ETÁRIA ANTES E APÓS SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	103
FIGURA 28 – RESULTADOS DO TESTE DE TBARS POR DISTÂNCIA PERCORRIDA ANTES E APÓS SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI.	104
FIGURA 29 – INFLUÊNCIA DOS SUBTIPOS DE HP NOS RESULTADOS DO TESTE DE TBARS.	105
FIGURA 30 – INFLUÊNCIA DOS TIPOS DE HP NOS RESULTADOS DO TESTE DE TBARS.	106
FIGURA 31 – INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS MN-SOD NOS RESULTADOS DO TESTE DE TBARS.	106

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DE CAROTENÓIDES E VITAMINAS DA POLPA DO PEQUI.	10
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DE SAIS MINERAIS DA POLPA DO PEQUI.....	10
TABELA 3: CLASSIFICAÇÃO DOS RADICAIS LIVRES.....	11
TABELA 4 – CONCENTRAÇÕES E QUANTIDADE DE REAGENTES (EM μ L) EMPREGADOS NAS PCRS DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS.	44
TABELA 5 – SEQUÊNCIA DE INICIADORES E ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS NAS ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS DE MN-SOD, CAT E GPX1.	44
TABELA 6 – CONCENTRAÇÕES E QUANTIDADE DE REAGENTES EMPREGADOS NA DIGESTÃO DOS PRODUTOS DA PCR DE MN-SOD COM NGO MVI.....	45
TABELA 7 – CONCENTRAÇÕES E QUANTIDADE DE REAGENTES EMPREGADOS NA DIGESTÃO DOS PRODUTOS DA PCR DE CAT COM <i>HINF</i> I.....	46
TABELA 8 – CONCENTRAÇÕES E QUANTIDADE DE REAGENTES EMPREGADOS NA DIGESTÃO DOS PRODUTOS DA PCR DE GPX1 COM <i>APA</i> I.	47
TABELA 9 – SEQUÊNCIA DE INICIADORES UTILIZADOS NA ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE HP.	49
TABELA 10 – PARES DE INICIADORES UTILIZADOS NA ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE HP E SEUS RESPECTIVOS TAMANHOS.....	49
TABELA 11 - RESULTADOS DO RENDIMENTO-MASSA OBTIDOS APÓS EXTRAÇÃO DA POLPA DO FRUTO DO PEQUI (<i>CARYOCAR BRASILIENSE</i> CAMB.) COM DIFERENTES SOLVENTES.	52
TABELA 12 – AVALIAÇÃO DE MICRONÚCLEOS (MN) NAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM SWISS ALBINO TRATADOS POR VIA ORAL (V.O.) COM EXTRATO ORGÂNICO (EOP) DA POLPA DO FRUTO DO PEQUI (<i>CARYOCAR BRASILIENSE</i> CAMB.), EXCLUSIVAMENTE OU CONJUGADO COM UMA ÚNICA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL (I.P.) DE BLEOMICINA (BLM) OU DE CICLOFOSFAMIDA (CP).....	54
TABELA 13 – TESTE DO COMETA EM LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM SWISS ALBINO TRATADOS POR VIA ORAL (V.O.) COM EXTRATO ORGÂNICO (EOP) OU EXTRATO AQUOSO (EAP) DA POLPA DO FRUTO DO PEQUI (<i>CARYOCAR BRASILIENSE</i> CAMB.), EXCLUSIVAMENTE OU CONJUGADOS COM INJEÇÃO INTRAPERITONEAL (I.P.) DE BLEOMICINA (BLM) OU CICLOFOSFAMIDA (CP)....	55
TABELA 14 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NO PLASMA (NÍVEIS DE TBARS) DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM SWISS ALBINO TRATADOS POR VIA ORAL (V.O.) COM EXTRATO ORGÂNICO (EOP) OU EXTRATO AQUOSO (EAP) DA POLPA DO FRUTO DO PEQUI (<i>CARYOCAR BRASILIENSE</i> CAMB.).	56
TABELA 15 – DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DOS LOCOS DE HAPTOGLOBINA, MN-SOD, CAT E GPX1 E PARÂMETROS DE DIVERSIDADE GENÉTICA. ..	58

TABELA 16 – DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DOS LOCOS DE HAPTOGLOBINA, MN-SOD, CAT E GPX1 E DADOS PARA O TESTE DE ADERÊNCIA AO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (EHW) PELO MÉTODO CONVENCIONAL DO CHI-QUADRADO (χ^2).....	58
TABELA 17 – DISTRIBUIÇÃO DOS ATLETAS POR FAIXA ETÁRIA (EM ANOS) NO GRUPO TOTAL E POR SEXO.	59
TABELA 18 – DISTRIBUIÇÃO DOS ATLETAS POR DISTÂNCIA PERCORRIDA (EM KM) PELO GRUPO TOTAL E POR SEXO.	59
TABELA 19 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NAS DOSAGENS SÉRICAS DE TGO, TGP E CPK DOS SEXOS MASCULINO E FEMININO.	61
TABELA 20 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NO ÍNDICE DE DANOS NO DNA (ID – TESTE DO COMETA) DOS SEXOS MASCULINO E FEMININO.	61
TABELA 21 – INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NOS TESTES DE TGO, TGP E CPK POR FAIXA ETÁRIA.	62
TABELA 22 – INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NO ÍNDICE DE DANOS NO DNA (ID – TESTE DO COMETA) POR FAIXA ETÁRIA.	63
TABELA 23 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE TGP E AS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS (EM ANOS).	63
TABELA 24 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE ID CONTROLE E AS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS (EM ANOS).....	64
TABELA 25 – INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NOS TESTES DE TGO, TGP E CPK POR DISTÂNCIA PERCORRIDA (EM KM).	65
TABELA 26 – INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NO ÍNDICE DE DANOS NO DNA (ID – TESTE DO COMETA) POR DISTÂNCIA PERCORRIDA (EM KM).	65
TABELA 27 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE TGO E AS DIFERENTES FAIXAS DE DISTÂNCIA PERCORRIDA (EM KM).....	66
TABELA 28 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE TGP E AS DIFERENTES FAIXAS DE DISTÂNCIA PERCORRIDA (EM KM).	66
TABELA 29 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE ID CONTROLE E AS DIFERENTES FAIXAS DE DISTÂNCIA PERCORRIDA (EM KM).....	67
TABELA 30 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NOS VALORES DAS VARIÁVEIS DO ERITROGRAMA DO GRUPO TOTAL E POR SEXO.....	70
TABELA 31 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NOS VALORES DAS VARIÁVEIS DO LEUCOGRAMA E DAS PLAQUETAS DO GRUPO TOTAL E POR SEXO.	70
TABELA 32 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NOS RESULTADOS DO ERITROGRAMA NAS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS.....	72

TABELA 33 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NOS RESULTADOS DO LEUCOGRAMA E DAS PLAQUETAS NAS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS.	73
TABELA 34 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE HEMÁCIAS E AS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS (EM ANOS).	74
TABELA 35 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE HEMOGLOBINA E AS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS (EM ANOS).	75
TABELA 36 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE VCM E AS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS (EM ANOS).	75
TABELA 37 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE HCM E AS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS (EM ANOS).	76
TABELA 38– P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE RDW E AS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS (EM ANOS).	77
TABELA 39 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE PLAQUETAS E AS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS (EM ANOS).	77
TABELA 40 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NOS RESULTADOS DO ERITROGRAMA NAS DIFERENTES FAIXAS DE DISTÂNCIA PERCORRIDA.	79
TABELA 41 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NOS RESULTADOS DO LEUCOGRAMA E DAS PLAQUETAS NAS DIFERENTES FAIXAS DE DISTÂNCIA PERCORRIDA. OS DADOS SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EP (ERRO PADRÃO DA MÉDIA).	79
TABELA 42 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE HEMOGLOBINA E AS DIFERENTES FAIXAS DE DISTÂNCIA PERCORRIDA (EM KM).	80
TABELA 43 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE RDW E AS DIFERENTES FAIXAS DE DISTÂNCIA PERCORRIDA (EM KM).	80
TABELA 44 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE PLAQUETAS E AS DIFERENTES FAIXAS DE DISTÂNCIA PERCORRIDA (EM KM).	81
TABELA 45 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NOS VALORES DAS VARIÁVEIS DO PERFIL LIPÍDICO PÓS-PRANDIAL DO GRUPO TOTAL E POR SEXO. ..	91
TABELA 46 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NOS VALORES DAS VARIÁVEIS DO PERFIL LIPÍDICO PÓS-PRANDIAL POR FAIXA ETÁRIA (EM ANOS).	92
TABELA 47 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DO COLESTEROL TOTAL NAS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS.	93

TABELA 48 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE TRIGLICERÍDEOS NAS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS (EM ANOS).....	94
TABELA 49 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE HDL NAS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS (EM ANOS).....	94
TABELA 50 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE LDL NAS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS (EM ANOS).	95
TABELA 51 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE VLDL NAS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS (EM ANOS).....	95
TABELA 52 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NOS VALORES DAS VARIÁVEIS DO PERFIL LIPÍDICO PÓS-PRANDIAL POR DISTÂNCIA PERCORRIDA (EM KM).....	96
TABELA 53 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE COLESTEROL TOTAL E AS DIFERENTES DISTÂNCIAS PERCORRIDAS (EM KM).....	97
TABELA 54 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE HDL E AS DIFERENTES DISTÂNCIAS PERCORRIDAS (EM KM).....	98
TABELA 55 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE LDL E AS DIFERENTES DISTÂNCIAS PERCORRIDAS (EM KM).....	98
TABELA 56 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DO TESTE DE TBARS E AS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS (EM ANOS).....	103
TABELA 57 – P-VALORES OBTIDOS NO TESTE LSD DE FISHER PARA COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DO TESTE DE TBARS E AS DIFERENTES FAIXAS DE DISTÂNCIA PERCORRIDA (EM KM).....	104
TABELA 58 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NA PRESSÃO ARTERIAL E NOS VALORES DA PCR-US DO GRUPO TOTAL E POR SEXO.....	107
TABELA 59 – P-VALORES OBTIDOS NA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A INFLUÊNCIA DOS FATORES TRATAMENTO COM CÁPSULAS DE PEQUI E SEXO NOS VALORES DA PRESSÃO ARTERIAL.....	108
TABELA 60 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NOS RESULTADOS DA PRESSÃO ARTERIAL E DA PCR-US POR FAIXA ETÁRIA.	108
TABELA 61 – INFLUÊNCIAS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEQUI NOS RESULTADOS DA PRESSÃO ARTERIAL E DA PCR-US POR DISTÂNCIA PERCORRIDA....	109
TABELA 62 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO PRO198LEU DO GENE GPX1 EM DIVERSAS POPULAÇÕES.....	115
TABELA 63 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO –21A/T NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE CAT EM DIVERSAS POPULAÇÕES.	117

LISTA DE ABREVIATURAS

EAP	extrato aquoso de pequi
EEP	extrato etanólico de pequi
EHEP	extrato hidro-etanólico de pequi
ECP	extrato clorofórmico (posteriormente denominado EOP ou óleo de pequi)
EOP	extrato orgânico de pequi (óleo de pequi)
EHP	extrato hexânico de pequi
BLM	bleomicina
CP	ciclofosfamida
RL	radicais livres
ERO	espécies reativas de oxigênio
ERN	espécies reativas de nitrogênio
$O_2^{\bullet-}$	radical superóxido
$HO^{\bullet}$	radical hidroxila
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
NADPH	forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ATP	adenosina trifosfato
TGO	transaminase glutâmica-oxalacética
TGP	transaminase glutâmica-pirúvica
CPK ou CK	creatina-fosfoquinase ou creatina-quinase; do inglês <i>creatine phosphokinase (creatine kinase)</i>
PCR	proteína C-reativa
PCR-US	proteína C-reativa ultra-sensível
TBARS	substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico; do inglês <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
MDA	malonaldeído
VCM	volume corpuscular médio
HCM	hemoglobina corpuscular média
CHCM	concentração hemoglobínica corpuscular média
RDW	amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos; do inglês <i>Red Cell Distribution Width</i>
VPM	volume plaquetário médio
PDW	índice de variação no tamanho da população de plaquetas; do inglês <i>Platelet Distribution Width</i>
AGPI	ácidos graxos poliinsaturados
AGMI	ácidos graxos monoinsaturados

AGS	ácidos graxos saturados
TG ou TAG	triglicerídeos ou triacilgliceróis
LDL	lipoproteína de baixa densidade; do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i>
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade; do inglês <i>Very Low Density Lipoprotein</i>
HDL	lipoproteína de alta densidade; do inglês <i>High Density Lipoprotein</i>
DCV	doença cardiovascular
DAC	doença arterial coronariana
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
SNP	polimorfismos de nucleotídeo único; do inglês <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>
Mn-SOD	enzima superóxido-dismutase (forma SOD-mangânês)
Mn-SOD (–Val9Ala)	polimorfismo Val9Ala na sequência-sinal mitocondrial do gene da Mn-SOD (NCBI, refSNP ID: rs1799725)
CAT	enzima catalase
CAT (–21A/T)	polimorfismo –21A/T na região promotora do gene da catalase (NCBI, refSNP ID: rs7943316)
GPX	enzima glutatona peroxidase
GPX1 (Pro198Leu)	polimorfismo Pro198Leu do gene da GPX1 (NCBI, refSNP ID: rs1050450)
Hp	haptoglobina
Hb	hemoglobina

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Pequi (Caryocar brasiliense Camb.)*

A espécie *Caryocar brasiliense* Camb., conhecida popularmente como pequizeiro, pequi, piqui ou piqui-do-cerrado, é uma árvore característica do Cerrado Brasileiro, pertencente à família Caryocaraceae. Apresenta altura variável – que pode ultrapassar 10 m – e madeira resistente, sendo usada em casos em que se exige uma alta durabilidade, como na fabricação de estacas, pilares, mourões e pilões. A casca é espessa e as folhas contêm altos teores de taninos, constituindo-se em matéria-prima para a fabricação de tinturas (Marques *et al.*, 2002).

O pequizeiro floresce de agosto a novembro e seus frutos iniciam a maturação a partir de setembro, podendo ser coletados de novembro até o início de fevereiro (Almeida e Silva, 1994; Almeida *et al.*, 1998; Vera *et al.* 2005). O fruto, do tipo drupa, possui de um a quatro caroços volumosos, cada qual contendo uma só semente ou amêndoa. É constituído por uma casca ou epicarpo de coloração esverdeada, por um mesocarpo externo de coloração branca, por um mesocarpo interno de coloração amarela e por um endocarpo espinhoso que protege a amêndoa. O mesocarpo interno envolve o caroço e separa-se facilmente do mesocarpo externo, constituindo a polpa comestível do fruto (Almeida e Silva, 1994; Ramos *et al.*, 2001).

A casca do fruto é espessa e composta por 50,94% de carboidratos totais, 39,97% de fibra alimentar, 1,54% de lipídeos e 5,76% de proteínas. É responsável por cerca de 84% do peso total, enquanto a polpa representa 10% e as sementes aproximadamente 6% (Barbosa e Amante, 2005; Boletim informativo UFMG nº 1511, 2005).

Cada 100 g de polpa contêm de 20 a 33,4% de lipídeos (que constituem o óleo da polpa), de 2,2 a 6,0% de proteína, 10,2 a 11,6% de fibras e 19,66 a 21,47% de carboidratos totais, além de diferentes compostos antioxidantes tais como diversos carotenóides, vitamina C, compostos fenólicos (flavonóides, taninos), saponinas e óleos essenciais (Almeida, 1998; Ramos *et al.*, 2001; Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, 2004; Paula-Júnior, 2004; Boletim informativo UFMG nº 1511, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2008; Roesler *et al.*, 2008).

A composição de ácidos graxos presentes no óleo da polpa é representada principalmente pelos ácidos oléico (48,7 a 57,4%) e palmítico (34,4 a 46,79%), além de componentes minoritários tais como os ácidos palmitoléico, linoléico, linolênico, esteárico e araquídico, entre outros (Araújo, 1995; Almeida, 1998; Facioli e Gonçalves, 1998; Segall *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2008).

Além de fornecer óleo comestível, a polpa é também muito utilizada na culinária regional – no preparo de pratos típicos, licores e doces – e também na medicina popular, para combater diversos tipos de afecções, principalmente aquelas do sistema respiratório (Almeida e Silva, 1994; Ramos *et al.*, 2001). O óleo de pequi é também utilizado na medicina popular para sanar problemas oftalmológicos relacionados à deficiência de vitamina A, fato justificado cientificamente pelo alto teor de carotenóides com atividade pró-vitamina A que contém (Almeida e Silva, 1994; Almeida, 1998; Ramos *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2008).

A polpa do pequi também é rica em sais minerais como cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, ferro e cobre (Almeida e Silva, 1994; Araújo, 1995; Almeida, 1998; Boletim informativo UFMG nº 1511, 2005), sendo também uma boa fonte de vitaminas B1 (Tiamina), B2 (Riboflavina) e B3 (Niacina, ácido nicotínico ou vitamina PP) (Araújo, 1995; Barbosa e Amante, 2005; Boletim informativo UFMG nº 1511, 2005; Almeida *et al.*, 2008).

Tabela 1 – Composição de carotenóides e vitaminas da polpa do pequi.

Carotenóides (mg/100g)			Vitaminas (mg/100g)			
Pró-vitamina A	Licopeno	Totais	C	B1	B2	B3
6,26 a 11,5	1,12 a 2,08	6,75 a 28,66	70,9 a 105	0,030	0,463	0,388

(Fontes: Almeida e Silva, 1994; Araújo, 1995; Almeida, 1998; Ramos *et al.*, 2001; Barbosa e Amante, 2005; Santos *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Boletim informativo UFMG nº 1511, 2005; Almeida *et al.*, 2008).

Tabela 2 – Composição de sais minerais da polpa do pequi.

Cálcio (mg/100g)	Fósforo (mg/100g)	Magnésio (g/100g)	Potássio (g/100g)	Sódio (mg/100g)	Ferro (mg/100g)	Cobre (mg/100g)
50 a 60	1,7 a 2,1	0,13	1,34	2,1	0,83 a 1,6	0,24 a 0,4

(Fontes: Almeida e Silva, 1994; Araújo, 1995; Almeida, 1998; Boletim informativo UFMG nº 1511, 2005; Almeida *et al.*, 2008).

Até a década de 1980, as informações sobre as possibilidades de uso da flora nativa do Cerrado eram poucas, mas a biodiversidade da região é rica e se equipara à da Amazônia – sua flora abriga mais de seis mil espécies (Embrapa Cerrados, 2003). Por ser o Cerrado a principal área de expansão agrícola do país, alguns recursos naturais de interesse sócio-econômico para as populações da região são eliminados para dar lugar a extensas áreas agropecuárias, impossibilitando a exploração destes recursos. Apesar da relativa produção de frutos, a destruição do pequizeiro não tem sido acompanhada por regeneração natural em escala significativa (Santos *et al.*, 2005).

O pequizeiro é uma das árvores do Cerrado Brasileiro com maior grau de aproveitamento, não só pelos frutos, mas pela árvore como um todo (Silva *et al.*, 2005) e vem sofrendo com o extrativismo e as queimadas para produção de carvão, que podem levá-lo à extinção (Embrapa, 2004; Santos *et al.*, 2006).

1.2. Radicais Livres (RL)

Radicaís livres (RL) podem ser definidos como espécies químicas que contêm número ímpar de elétrons (elétrons não-pareados em sua última camada eletrônica). Essa configuração faz com que sejam altamente instáveis, tenham meia-vida curtíssima e sejam quimicamente muito reativos. Provocam ou resultam de reações de oxidação-redução e multiplicam-se rapidamente em cascata pelo sequestro de elétrons de outras moléculas, que também se transformam em RL (Ferreira e Matsubara, 1997; Bianchi e Antunes, 1999; Batello, 2002; Hermes-Lima, 2004). Os RL podem apresentar o elétron não-pareado centrado no átomo de oxigênio ou no átomo de nitrogênio, sendo denominados respectivamente de “espécies reativas de oxigênio” (ERO) e de “espécies reativas de nitrogênio” (ERN) (Hermes-Lima, 2004; Barreiros *et al.*, 2006). ERO e ERN podem também ser espécies não radicalares (não apresentam número ímpar de elétrons), mas que são capazes de gerar espécies danosas e altamente reativas (Tabela 3) (Ferreira e Matsubara, 1997; Barreiros *et al.*, 2006).

Tabela 3: Classificação dos Radicais Livres

ESPÉCIES RADICALARES		ESPÉCIES NÃO-RADICALARES	
ERO	ERN	ERO	ERN
Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Óxido nítrico ($NO^{\bullet}$)	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Óxido nitroso (N_2O_3)
Hidroxila ($HO^{\bullet}$)	Dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\bullet}$)	Hidroperóxido de alquila ($ROOH$)	Ácido nitroso (HNO_2)
Peroxila ($ROO^{\bullet}$)		Oxigênio singlete (1O_2)	Nitritos (NO_2^-)
Alcoxila ($RO^{\bullet}$)		Ozônio (O_3)	Nitratos (NO_3^-)
Hidroperoxila ($HOO^{\bullet}$)		Ácido hipocloroso ($HOCl$)	Peroxinitritos ($ONOO^-$)

Fontes: Hermes-Lima, 2004; Barreiros *et al.*, 2006.

Entre as ERO mais comuns, podemos citar o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Dessas, o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$) é o mais deletério para o organismo, uma vez que, devido a sua meia-vida muito curta, dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. É formado no organismo principalmente por dois mecanismos: homólise da água por exposição à radiação ionizante e reação de H_2O_2 com metais de transição (Hermes-Lima, 2004;

Saeed *et al.*, 2005; Barreiros *et al.*, 2006). Frequentemente ataca as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações, causando danos no DNA, no RNA, nas proteínas, nos lipídios, nos carboidratos e nas membranas celulares (Hermes-Lima, 2004; Barreiros *et al.*, 2006). No DNA ele ataca tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose e quase sempre leva à ruptura da cadeia. O mecanismo dessa ruptura tem como principais produtos 8-hidroxi-2'-desoxiadenosina (8OHdA) e 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8OHdG) (Cooke *et al.*, 2003; Barreiros *et al.*, 2006; Radak *et al.*, 2007).

O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é menos reativo que o radical hidroxila, apresenta meia vida mais longa e é capaz de reagir com as moléculas por mais tempo. Em condições fisiológicas é gerado principalmente nas mitocôndrias como resultado do metabolismo oxidativo normal. Também é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (Ferreira e Matsubara, 1997; Hermes-Lima, 2004; Andrade-Júnior *et al.*, 2005).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie não-radicalar pouco reativa frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. É gerado *in vivo* pela dismutação do ânion-radical superóxido por enzimas oxidases ou pela oxidação de ácidos graxos. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical hidroxila, principalmente na presença de metais de transição como ferro e cobre. Nesse sistema, a importância do ferro é mais pronunciada devido à sua maior biodisponibilidade. (Hermes-Lima, 2004; Barreiros *et al.*, 2006).

1.3. Sistema de defesa antioxidante

As ERO são produzidas naturalmente em nosso organismo através de processos metabólicos oxidativos que ocorrem nas mitocôndrias, no retículo endoplasmático, nos lisossomas, nas membranas celulares, nos peroxissomas e no citosol (Ferreira *et al.*, 2007). As mitocôndrias usam 85-90% do oxigênio que respiramos; os 10-15% restantes são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e também por reações químicas de oxidação direta que ocorrem nos outros compartimentos celulares citados (Schneider e Oliveira, 2004; Ferreira *et al.*, 2007).

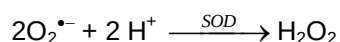
Pelo simples fato de consumir oxigênio, o metabolismo celular, mesmo em situações basais, promove uma contínua formação de ERO, através da redução da molécula de oxigênio (Schneider e Oliveira, 2004; Ferreira *et al.*, 2007). Em razão da sua configuração eletrônica, o oxigênio tem forte tendência a receber um elétron de cada vez. A redução univalente do oxigênio leva à formação do radical $O_2^{\bullet-}$ (Hermes-Lima, 2004; Schneider e Oliveira, 2004; Ferreira *et al.*, 2007).

Como os RL são continuamente formados em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo aeróbico, todas as células corporais possuem um sistema de defesa antioxidante para suavizar seus efeitos agressores. Tal sistema antioxidante está dividido em enzimático e não-enzimático. O primeiro inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX). Já o sistema não-enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo tais como haptoglobina, bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, e outros obtidos através da dieta como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), carotenóides e compostos fenólicos de plantas (Sies, 1993; Schneider e Oliveira, 2004; Tseng *et al.*, 2004). No entanto, a capacidade antioxidante de um organismo depende não só do papel específico de cada mecanismo antioxidante, como também da cooperação entre os mesmos. As formas como as defesas se complementam difere não só entre os organismos ou tecidos, mas também entre os compartimentos celulares (Schneider e Oliveira, 2004; Ferreira *et al.*, 2007).

1.3.1. Sistema enzimático de defesa antioxidante

1.3.1.1. Superóxido dismutase (SOD)

Corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos mamíferos existem três formas de SOD: a forma SOD-cobre/zinco (Cu/Zn-SOD) presente no citosol, a forma SOD-mangânês (Mn-SOD) localizada na mitocôndria e a forma SOD-extracelular (EC-SOD), outra forma cobre/zinco encontrada nos compartimentos extracelulares como plasma, fluido espinhal e linfa (Hermes-Lima, 2004; Oberley, 2005). Estas enzimas catalisam a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , como mostrado abaixo (Ferreira e Matsubara, 1997; Akyol *et al.*, 2004; Hermes-Lima, 2004; Schneider e Oliveira, 2004; Barreiros *et al.*, 2006).

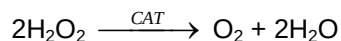


A Mn-SOD (EC 1.15.1.1) tem sua atividade induzida por ERO, citocinas, tabagismo e etanol (Martin *et al.*, 2009). Os níveis mais altos dessa enzima são encontrados no coração, cérebro, fígado e rins (Forsberg *et al.*, 2001a).

1.3.1.2. Catalase (CAT)

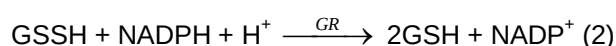
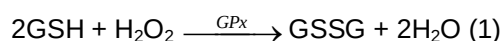
A catalase (EC 1.11.1.6) é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução de H_2O_2 a H_2O e O_2 , como mostrado abaixo. É encontrada em praticamente todos os órgãos, estando particularmente concentrada nos hepatócitos e nos eritrócitos. O cérebro, o coração, e os músculos esqueléticos contêm pequenas quantidades e sua atividade varia entre os diversos músculos e em diferentes regiões de um mesmo músculo. Dentro das células encontra-se no

interior dos peroxissomos e sua atividade é dependente de NADPH (Ferreira e Matsubara, 1997; Forsberg *et al.* 2001b; Hermes-Lima, 2004; Schneider e Oliveira, 2004; Barreiros *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Cemeli *et al.*, 2009).



1.3.1.3. Sistema Glutathiona

Este sistema é composto pela glutathiona (GSH) em conjunto com duas enzimas: glutathiona peroxidase (GPX) e glutathiona redutase (GR). A GPX é uma selenoproteína que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio e de peróxidos orgânicos (lipídicos e não-lipídicos) a água e oxigênio, usando glutathiona reduzida (GSH) como co-substrato. A glutathiona então oxidada (GSSG) pode ser novamente reduzida à GSH pela enzima GR, como mostrado nas equações abaixo (Ferreira e Matsubara, 1997; Hermes-Lima, 2004; Schneider e Oliveira, 2004; Barreiros *et al.*, 2006).



A GPX é distribuída extensamente nos tecidos animais e humanos. Seus níveis são elevados no rim, no fígado e no sangue total (Cemeli *et al.*, 2009). Dentro das células está presente no citosol e nas mitocôndrias (Shinkai *et al.*, 2006). A enzima é um homotetrâmero contendo selênio como co-fator e sua atividade é influenciada por fatores tais como sexo, dieta e tabagismo (Bastaki *et al.*, 2006).

1.3.2. Sistema não-enzimático de defesa antioxidante

Neste tópico, serão abordados apenas alguns compostos de maior interesse para este trabalho. Dentre os compostos obtidos através da dieta abordaremos a vitamina C, a vitamina E e os carotenóides, enquanto no grupo de compostos sintetizados pelo organismo, apenas a haptoglobina será abordada.

1.3.2.1. Vitamina E (α -tocoferol)

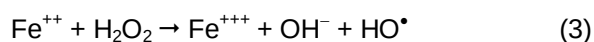
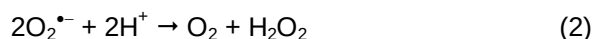
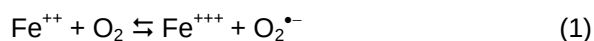
Confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação ou como doador de hidrogênio para o radical peroxila, interrompendo a reação radicalar em cadeia. É um importante antioxidante lipofílico, mas esta função poderá ser limitada em situações de sobrecarga de ferro (Ferreira e Matsubara, 1997; Barreiros *et al.*, 2006;

Cemeli *et al.*, 2009). A vitamina E se mostra mais eficiente quando há altas tensões de O₂ no meio (Ferreira e Matsubara, 1997).

Cada molécula de tocoferol pode reagir com até dois radicais peroxila e, neste caso, o tocoferol é irreversivelmente desativado. Para que eles não se desativem, necessitam do mecanismo de regeneração sinérgico com o ascorbato nas membranas celulares ou com a ubiquinona na membrana mitocôndrial (Barreiros *et al.*, 2006).

1.3.2.2. Vitamina C (ácido ascórbico)

É comumente encontrada em nosso organismo na forma de ascorbato. Por ser um antioxidante hidrossolúvel, está localizada nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos (Hermes-Lima, 2004; Barreiros *et al.*, 2006) e pode neutralizar diretamente as ERO (Ferreira e Matsubara, 1997). Desempenha papéis metabólicos fundamentais no organismo humano ao atuar como agente redutor, particularmente de metais de transição como Fe³⁺ e Cu²⁺ presentes nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo. Entretanto, quando em dose elevada pode também atuar como pró-oxidante, levando à lipoperoxidação (Ferreira e Matsubara, 1997; Hermes-Lima, 2004; Barreiros *et al.*, 2006), pois os íons Fe²⁺ e Cu¹⁺ reagem com o peróxido de hidrogênio na reação de Fenton, gerando o radical hidroxila, como exemplificado abaixo (Barreiros *et al.*, 2006).



A vitamina C trabalha conjuntamente com a vitamina E, uma vez que é capaz de regenerar o tocoferol e de reagir com as ERO e com radicais peroxila em fase aquosa (Cruzat *et al.*, 2007; Cemeli *et al.*, 2009). Desse modo, a vitamina C pode ajudar a impedir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), evento principal de início da aterosclerose (Cemeli *et al.*, 2009).

1.3.2.3. Carotenóides

Os carotenóides são importantes sequestradores de oxigênio singlete (¹O₂ – oxigênio triplete ou no estado excitado), tendo sido reconhecidos pela sua alta capacidade antioxidante (Hermes-Lima, 2004; Gomes *et al.*, 2005), especialmente em condições de baixa tensão de O₂ (Ferreira e Matsubara, 1997; Gomes *et al.*, 2005). O oxigênio singlete é uma espécie não-radicalar de ERO de vida média relativamente longa, capaz de atacar os ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) das membranas, resíduos de aminoácidos nas proteínas, DNA e até mesmo carotenóides

(Hermes-Lima, 2004) comumente encontrados no plasma humano, tais como o α -caroteno, o β -caroteno, a β -criptoxantina, a luteína e o licopeno (Gomes *et al.*, 2005). Dentre os diversos carotenóides encontrados na natureza, o β -caroteno, além de ser o mais potente precursor de vitamina A e ser capaz de inativar várias espécies de oxigênio singlete antes de ser destruído, ainda é reconhecido como sequestrador de radicais peroxila, especialmente em condições de baixa tensão de oxigênio (Gomes *et al.*, 2005).

1.3.2.4. Haptoglobina (Hp)

A hemoglobina (Hb) é a proteína mais abundante e funcionalmente importante dos eritrócitos. Todavia, uma vez liberada das células vermelhas do sangue, torna-se altamente tóxica devido à natureza oxidativa dos íons ferro contidos no grupo heme, os quais participam da reação de Fenton para produzir ERO, que causam injúria celular (Wassel, 2000; Tseng *et al.*, 2004).

A haptoglobina (Hp) é uma conhecida glicoproteína de fase aguda da fração α -2-globulina do plasma, que pode capturar Hb por formar um complexo de alta afinidade Hp-Hb. O complexo formado é então metabolizado nos hepatócitos através de um processo mediado pelo receptor CD163 de macrófagos. Sendo assim, Hp funciona como um antioxidante por sua habilidade de se ligar à Hb e reduzir a geração de RL mediada pelo ferro (Langlois *et al.*, 1997; Melamed-Frank *et al.*, 2001; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004; Levy, 2004; Tseng *et al.*, 2004; Guéye *et al.*, 2006).

A Hp humana contém dois tipos de cadeias polipeptídicas: α (leve: α^1 de 8,9 kDa e α^2 de 16 kDa) e β (pesada, de 40 kDa), ligadas por pontes dissulfeto. As cadeias β são idênticas, enquanto as cadeias α podem apresentar diferentes variações e são responsáveis por três fenótipos diferentes, Hp1-1, Hp1-2 e Hp2-2 (Figura 1). Esses fenótipos diferem entre si no número de componentes protéicos, na mobilidade eletroforética, na concentração plasmática de Hp e nas atividades antioxidante e antiinflamatória, apresentando consequências clínicas diferentes (Langlois e Delanghe, 1996; Yano *et al.*, 1998; Wassel, 2000; Koch *et al.*, 2003; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004; Tseng *et al.*, 2004; Carter e Worwood, 2007).

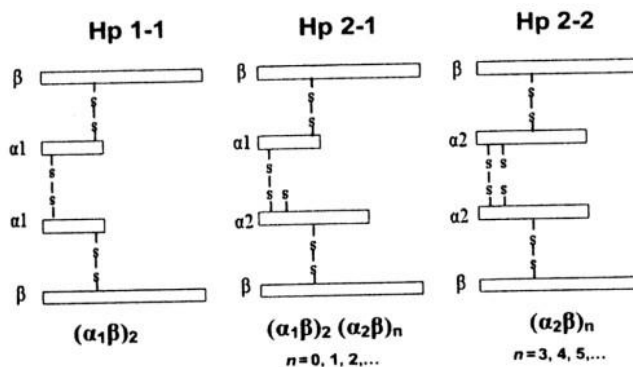


Figura 1: Desenho esquemático da estrutura da Hp humana.

Todos os três fenótipos compartilham uma estrutura comum de cadeias β , enquanto Hp 2-1 e 2-2 são formas poliméricas heterogêneas. O grau de polimerização dentro do arranjo intermolecular é mostrado. Devido a um grupo tiol extra na cadeia α^2 , Hp 2-1 e 2-2 podem formar grandes polímeros (Tseng *et al.*, 2004).

Várias propriedades funcionais dos fenótipos Hp têm sido descritas como consequência direta de sua capacidade de ligação com Hb na circulação, da concentração plasmática, das velocidades de acesso aos espaços extravasculares e de remoção do complexo Hb-Hp pelo receptor CD163 de macrófagos e consequente proteção contra o estresse oxidativo e imunomodulação. A capacidade antioxidante de Hp2-2 é menor do que a de Hp1-1, uma vez que apresenta menor concentração plasmática e, em decorrência da alta massa molecular, sua distribuição nos fluidos extravasculares é limitada. Consequentemente, a capacidade antioxidante dos fluidos corporais extravasculares também é menos eficiente em indivíduos Hp 2-2. Hp2-1 apresenta concentração plasmática e atividade antioxidante intermediárias entre Hp 1-1 e Hp 2-2 (Langlois e Delanghe, 1996; Wassel, 2000; Melamed-Frank *et al.*, 2001; Sadrzadeh e Bozorgehr, 2004; Van Vlierberghe *et al.*, 2004; Guéye *et al.*, 2006).

Apesar da Hp se expressar nos pulmões, pele, baço, rins e tecido adiposo, o fígado é o principal órgão de sua síntese, a qual aumenta durante a resposta de fase aguda e também por ação de hormônio de crescimento, insulina, endotoxina bacteriana, prostaglandina e citocinas tais como a interleucina-6 (IL-6), e diminui durante períodos de hemólise (Langlois *et al.*, 1997; Wassel, 2000).

1.4. Estresse Oxidativo

O desequilíbrio entre a produção de RL (particularmente ERO) e a capacidade de defesa do organismo contra essas espécies, levando a um progressivo dano oxidativo, é chamado de estresse oxidativo (Cooke *et al.*, 2003; Schneider e Oliveira, 2004; Akyol *et al.*, 2005; Hercberg *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2007).

A presença dos RL é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais dos organismos aeróbicos. No corpo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (Harman, 1956; Saeed *et al.*, 2005; Barreiros *et al.*, 2006; Valko *et al.*, 2007; Lecarpentier, 2007). No entanto, se não controlados, podem provocar danos extensivos. Seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios das membranas celulares (levando à lise celular) e a agressão a proteínas, carboidratos e DNA (provocando quebras de fita simples, de fita dupla, além de aberrações cromossômicas) (Dizdaroglu, 1992; Imlay e Linn, 1988; Cooke *et al.*, 2003; Barreiros *et al.*, 2006; Traber, 2006; Valko *et al.*, 2007; Radak *et al.*, 2007). Dessa forma, encontram-se relacionados ao envelhecimento, a várias patologias tais como câncer, desordens neurológicas, doenças inflamatórias crônicas, doenças cardiovasculares e até mesmo fadiga muscular durante o exercício extenuante, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (Langlois e Delanghe, 1996; Wassel, 2000; Cooke *et al.*, 2003; Janaydeh *et al.*, 2004; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004; Hermes-Lima, 2004; Barreiros *et al.*, 2006). Portanto, o balanço entre o estresse oxidativo e as funções antioxidantes naturais do organismo tem papel crucial na prevenção ou no desenvolvimento das doenças relacionadas (Langlois e Delanghe, 1996; Wassel, 2000; Cooke *et al.*, 2003; Janaydeh *et al.*, 2004; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004).

RL também podem ser produzidos por ação direta ou indireta de agentes exógenos. A indução de estresse e dano oxidativos tem sido observada após exposição à radiação ultravioleta (UV), raios gama, ozônio e a vários xenobióticos, incluindo antibióticos, agentes antineoplásicos, pesticidas, íons metálicos, asbesto e fumaça de cigarro (Banerjee *et al.*, 2001; Carnevali *et al.*, 2003; Cooke *et al.*, 2003; Bhattacharya *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2006; Hassett e Imlay, 2007; Ozben, 2007).

1.5. Exercícios físicos e estresse oxidativo

Hoje é unanimemente aceito que o exercício físico, quando praticado de forma regular, é determinante para a aquisição de um estilo de vida saudável, comportando-se como um agente terapêutico e/ou de prevenção para numerosas doenças. No entanto, em franca oposição aos seus potenciais efeitos benéficos, o exercício físico agudo, sobretudo se inabitual ou exaustivo, induz alterações orgânicas nefastas, especialmente quando os diferentes tecidos, órgãos ou sistemas não se encontram suficientemente adaptados para suportar, sem grandes alterações homeostáticas, os diferentes tipos de sobrecarga que lhes são impostas (Ferreira *et al.*, 2007). O exercício agudo é um modelo bem aceito para induzir estresse oxidativo (Ji, 1995; Alessio *et al.*, 2002). Desde o final da década de 1970 os RL têm sido relacionados a danos tissulares induzidos pelo exercício (Ji, 1995). Décadas de pesquisa em exercício e estresse oxidativo têm contribuído para uma melhor compreensão dos mecanismos que fundamentam os potenciais perigos do

exercício agudo exaustivo e os benefícios do exercício crônico para a saúde (Alessio *et al.*, 2002; Cruzat *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007).

Uma produção fraca de RL é necessária para a atividade contrátil normal do músculo esquelético. A geração de RL por miócitos é potencialmente importante porque parece desempenhar um papel significativo na homeostase redox, modulando vários sistemas regulatórios envolvidos no desempenho do músculo esquelético. Também podem ter efeitos considerados positivos sobre o sistema imune (Cruzat *et al.*, 2007; Lecarpentier, 2007). Entretanto, exercícios físicos intensos e prolongados têm sido associados com o aumento da geração de ERO e de ERN. Durante atividade física intensa o consumo de oxigênio pelo músculo esquelético pode aumentar até 100-200 vezes, levando ao estresse oxidativo como resultado da produção aumentada de ERO (Mastaloudis *et al.*, 2004; Traber, 2006). Este aumento causa dano oxidativo no DNA e na musculatura esquelética, o que pode desencadear envelhecimento prematuro e graves lesões musculares com consequente processo inflamatório, fatos que implicam em prejuízo no desempenho e possivelmente *overtraining* (Ji e Leichtweis, 1997; Sureda *et al.*, 2005; Finaud *et al.*, 2006; Traber, 2006; Cruzat *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007; Lecarpentier, 2007; Radak *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2007). Não obstante, o treinamento físico, trabalhando paralelamente com o sistema de reparo, é um conhecido indutor de enzimas antioxidantes (Ji e Leichtweis, 1997; Villa-Caballero *et al.*, 2000; Belviranli e Gökbel, 2006; Cruzat *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007; Judge e Leeuwenburgh, 2007; Radak *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2008). Em animais tem sido demonstrado que o coração, o fígado e o pulmão evidenciam também melhorias na sua capacidade antioxidante após treinamento físico (Ferreira *et al.*, 2007).

Embora o treinamento físico induza adaptações benéficas, a realização de exercícios intensos ou prolongados, acima da intensidade habitual de esforço ou com frequência de treinamento muito elevada, suplanta a capacidade do sistema antioxidante endógeno e geralmente resulta em lesão oxidativa. Esta sobrecarga oxidativa, apesar de se fazer sentir mais intensamente nos músculos esqueléticos, tem sido relatada também em muitos outros órgãos e sistemas corporais responsáveis pela regulação e manutenção da homeostase (Cruzat *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Lecarpentier, 2007), incluindo coração (Ferreira *et al.*, 2007), fígado (Nagel *et al.*, 1990; De Paz *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007), rins, pulmões (Ferreira *et al.*, 2007), eritrócitos (Schmidt *et al.*, 1988; Sureda *et al.*, 2005; Yusof *et al.*, 2007) e sistema imune (Ji, 1999; Mooren *et al.*, 2002; Sureda *et al.*, 2005; Belviranli e Gökbel, 2006; Cruzat *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007) e ósteo-articular (Ferreira *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). De fato, as acentuadas alterações hormonais, assim como as alterações térmicas, associadas ao exercício intenso e exaustivo far-se-ão sentir, de forma mais ou menos intensa, na maior parte das células corporais (Ferreira *et al.*, 2007). Adicionalmente também ocorre aumento do estresse mecânico imposto às fibras musculares esqueléticas solicitadas e às células dos sistemas ósteo-articular e cardiovascular (Ferreira *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007).

O fenômeno de isquemia/reperfusão, que pode ocorrer durante o exercício físico ou após trauma, também é um importante fator no processo de produção de ERO (Schneider e Oliveira, 2004; Finaud *et al.*, 2006; Cruzat *et al.*, 2007). Períodos de exercício intenso podem aumentar o estresse oxidativo devido à hipóxia e à reoxigenação temporárias que ocorrem no músculo exercitado, em função das contrações e relaxamentos estabelecidos ciclicamente. Durante a contração, a compressão vascular estabelece um quadro de isquemia e, portanto, de hipóxia; no relaxamento ocorre a reperfusão e, conseqüentemente, a reoxigenação (Schneider e Oliveira, 2004). Uma vez que durante o exercício a circulação sanguínea é desviada para os músculos em atividade, outros tecidos também podem sofrer hipóxia temporária (Cruzat *et al.*, 2007). Como consequência, esses tecidos recebem uma grande quantidade de oxigênio após o exercício, favorecendo a geração de ERO (Schneider e Oliveira, 2004; Finaud *et al.*, 2006; Cruzat *et al.*, 2007). No processo de isquemia/reperfusão, o aumento do estresse oxidativo durante e após o exercício é favorecido pelo catabolismo das purinas. Tem sido proposto que a conversão da enzima xantina-desidrogenase à sua forma oxidada (xantina-oxidase), mediante proteases intracelulares ativadas por Ca^{2+} , favorece o aumento de ERO. Durante a hipóxia, o ATP é degradado até hipoxantina, que se acumula nos tecidos. Como resultado, há falência da homeostase celular, permitindo o influxo de Ca^{++} para as células, o que ativa proteases intracelulares a converterem a enzima xantina desidrogenase em xantina oxidase. Na reperfusão a xantina oxidase utiliza O_2 para promover a conversão de hipoxantina em xantina e posteriormente em ácido úrico, ocorrendo redução univalente de oxigênio molecular a $\text{O}_2^{\bullet-}$, com conseqüente geração de H_2O_2 e $\text{HO}^\bullet$ (Ji, 1999; Campos e Yoshida, 2004; Finaud *et al.*, 2006; Cruzat *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007).

1.5.1. Musculatura esquelética e estresse oxidativo

No músculo esquelético, apesar da mitocôndria constituir a principal fonte e, simultaneamente, o principal alvo das ERO, as atividades das enzimas xantina oxidase e fosfolipase A2, a desaminação das catecolaminas e a infiltração de leucócitos pós-exercício contribuem como fontes adicionais de ERO e, conseqüentemente, com as lesões oxidativas (Ferreira *et al.*, 2007). A mioglobina também por ser oxidada por auto-oxidação ou por RL durante isquemia/reperfusão, com produção de H_2O_2 . A mioglobina pode então interagir com H_2O_2 e produzir outros radicais tais como o radical peroxila (Finaud *et al.*, 2006).

A lesão muscular pode ser avaliada diretamente através de técnicas histológicas ou microscopia eletrônica, ou indiretamente pela determinação do efluxo de enzimas citosólicas específicas para a circulação sanguínea (Cruzat *et al.*, 2007; Foschini *et al.*, 2007), podendo variar desde uma lesão ultra-estrutural de fibras musculares até traumas envolvendo a completa ruptura do músculo. As características morfológicas e ultra-estruturais da lesão induzida pelo exercício estão bem documentadas em modelos animais e humanos (Armstrong *et al.*, 1983; Gibala *et al.*,

1995; Morgan e Allen, 1999; Proske e Morgan, 2001; Stupka *et al.*, 2001; Magauidda *et al.*, 2004). A lesão muscular induzida pela realização de uma sessão de exercícios excêntricos pode ser decorrente da ruptura de tecidos conectivos ligados a miofibrilas adjacentes, da própria célula muscular, da lâmina basal adjacente à membrana plasmática, da membrana plasmática da célula muscular, do sarcômero, do retículo sarcoplasmático, ou ainda de uma combinação desses componentes (Cruzat *et al.*, 2007).

Em humanos, por razões éticas e logísticas, as evidências de estresse e lesão oxidativos induzidos pelo exercício agudo têm sido essencialmente estudadas em nível sanguíneo, quer no plasma, quer nas células circulantes (Ferreira *et al.*, 2007). Neste contexto, o aumento da concentração de proteínas citosólicas na circulação após o exercício reflete a lesão muscular. As proteínas avaliadas frequentemente são a creatina quinase (CPK), a lactato desidrogenase (LDH), a transaminase glutâmico-oxalacética (TGO – também chamada de aspartato aminotransferase ou AST) e a mioglobina, que, normalmente, são incapazes de atravessar a membrana plasmática. A presença dessas proteínas na circulação sanguínea reflete significativa alteração na estrutura e permeabilidade da membrana miofibrilar (Cruzat *et al.*, 2007; Apple *et al.*, 1988; Agarwal e Ankra-Badu, 1999; Barbosa *et al.*, 2003; Lac e Maso, 2004; Gasper e Gilchrist 2005; Foschini *et al.*, 2007). Dentre elas, a CPK é frequentemente descrita como melhor marcador indireto de dano muscular, sobretudo após o exercício de força ou outros exercícios que exijam ações predominantemente excêntricas (Barbosa *et al.*, 2003; Foschini *et al.*, 2007).

1.5.2. Miocárdio e estresse oxidativo

À semelhança do que foi descrito para o músculo esquelético, hoje é unanimemente aceito que o exercício agudo, sobretudo se exaustivo, promove também elevação do estresse oxidativo no coração, induzindo a um aumento de marcadores de lesão oxidativa neste órgão (Ferreira *et al.*, 2007). O miocárdio parece ser particularmente susceptível a todas as situações que promovam uma elevação do seu metabolismo, nas quais se incluem o exercício físico agudo, uma vez que a sua capacidade metabólica oxidativa é muito elevada devido à abundância de mitocôndrias (Ferreira *et al.*, 2007; Judge e Leeuwenburgh, 2007). O estresse oxidativo aumentado neste órgão durante o exercício agudo é resultado de aumentos dramáticos no consumo de oxigênio (Judge e Leeuwenburgh, 2007). Nestas condições, a reação da CPK é importante para a rápida ressíntese de ATP a partir de creatina fosfato e ADP, uma vez que o coração aumenta seu trabalho (Putney *et al.*, 1984; Nascimben *et al.*, 1996; Foschini *et al.*, 2007). Considerando que CPK é uma enzima citosólica, níveis séricos aumentados dessa enzima após exercício agudo podem ser também indicativos de lesão oxidativa no miocárdio.

Várias evidências sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese de doenças cardiovasculares (Wattanapitayakul e Bauer, 2001; Molavi e Mehta, 2004; Abramson *et al.*, 2005; Belardinelli, 2007; Kasap *et al.*, 2007). A presença de níveis plasmáticos

elevados de alguns marcadores do estado inflamatório, como a proteína C-reativa (PCR) é um fator preditivo de risco de síndrome coronariana aguda, infarto do miocárdio, doença arterial periférica oclusiva e morte cardíaca súbita, tanto em indivíduos saudáveis, como em pacientes com doença aterosclerótica estabelecida (Mitka, 2004; Dummer *et al.*, 2007). Níveis séricos aumentados da enzima TGO foram usados na diagnose de infarto agudo do miocárdio desde 1954. Essa transaminase é encontrada no citoplasma e nas mitocôndrias de muitas células, principalmente do fígado, coração, músculos esqueléticos, rins, pâncreas e hemácias (Dewar *et al.*, 1958). Apesar dos marcadores citados não serem específicos para verificar lesões no miocárdio, aumentos nos níveis plasmáticos de proteína C-reativa e TGO após exercício agudo também podem ser indicativos de lesão oxidativa no miocárdio.

1.5.3. Fígado e estresse oxidativo

Exercícios igualmente induzem a formação de ERO e danos oxidativos no fígado, tais como a peroxidação lipídica (Witt *et al.*, 1992; Nagel *et al.*, 1990; De Paz *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). A quantidade de dano depende da intensidade do exercício e do estado de treinamento (Witt *et al.*, 1992). O fígado apresenta alta taxa metabólica, a qual está naturalmente associada com o alto fluxo de oxigênio. Entretanto, este fluxo diminui significativamente durante o exercício, devendo ser similar ao fenômeno de isquemia/reperfusão (Radak *et al.*, 2008). Diferentemente do músculo esquelético, o fígado contém altos níveis de xantina desidrogenase a qual, durante o exercício, é convertida em xantina oxidase, que por sua vez contribui como fonte adicional de ERO e, conseqüentemente, com danos oxidativos (Ferreira *et al.*, 2007; Radak *et al.*, 2008). Enquanto um único turno de exercício intenso estimula adaptações no sistema antioxidante do músculo esquelético (Ji e Fu, 1992; Alessio *et al.*, 2002; Cruzat *et al.* 2007; Ferreira *et al.*, 2007; Radak *et al.* 2007), o mesmo não ocorre com o fígado, que fica oxidativamente estressado (Ji e Fu, 1992; Radak *et al.* 2007). Todavia, semelhantemente ao músculo esquelético, tem sido demonstrado em animais que o treinamento físico também promove melhorias na capacidade antioxidante do fígado (Wataru *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2007). Em ratos, como resultado de adaptação induzida pelo treinamento físico, ocorre indução de enzimas antioxidantes e a produção de ERO é reduzida (Wataru *et al.*, 2003; Radak *et al.*, 2008).

A lesão hepática pode ser evidenciada pelo efluxo de algumas enzimas citosólicas para a circulação sanguínea, particularmente a TGO e a TGP (transaminase glutâmico-pirúvica), também chamada de ALT (alanina aminotransferase); esta última é encontrada em altas concentrações apenas no fígado (Bruce *et al.*, 1958; Dewar *et al.*, 1958; Almersjö *et al.*, 1968; Chalifoux e Lagacé, 1969). Conseqüentemente, níveis séricos aumentados dessas enzimas após exercício agudo servem como indicativos de lesão oxidativa neste órgão.

1.5.4. Sangue e estresse oxidativo

1.5.4.1. Eritrócitos e estresse oxidativo

Tem sido sugerido que exercícios intensos de longa duração e treinamentos exaustivos podem também comprometer nossa capacidade de detoxificar ERO dentro das células sanguíneas e os eritrócitos parecem muito mais vulneráveis aos danos oxidativos (Petibois e Délérís, 2005; Sureda *et al.*, 2005). Isto decorre de sua capacidade biossintética muito limitada (ausência de núcleo), de um mecanismo de reparo pobre (Santos-Silva *et al.*, 2001; Cazzola *et al.*, 2003; Sureda *et al.*, 2005), da presença de grandes quantidades de tióis (R-SH) e de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) na sua membrana e da alta concentração interna de oxigênio e hemoglobina, fontes potencialmente promotoras de processos oxidativos (Ferreira e Matsubara, 1997; Cazzola *et al.*, 2003; Feksa *et al.*, 2008).

Apesar de possuírem um elaborado sistema de defesa antioxidante que inclui enzimas tais como a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, se a eficiência deste sistema for superada pela magnitude dos processos oxidativos, ocorrerá o estresse oxidativo, que culminará em hemólise (Ferreira e Matsubara, 1997; Feksa *et al.*, 2008). Neste caso, a hemoglobina extracelular se torna tóxica devido à natureza oxidativa dos íons ferro contidos no grupo heme, os quais participam da reação de Fenton para produzir ERO, que causam injúria celular (Stern, 1985; Josephy *et al.*, 1997).

Durante o estresse oxidativo as alterações mais comuns são a peroxidação dos lipídeos e das proteínas da membrana, o que pode desestabilizar o citoesqueleto e comprometer a sobrevivência da célula (Petibois e Délérís, 2005; Sureda *et al.*, 2005; Yusof *et al.*, 2007). Adicionalmente, os eritrócitos também estão altamente expostos ao estresse mecânico, assim como a mudanças de pH citosólico e extracelular (Petibois e Délérís, 2005).

As ERO podem alterar as propriedades químicas e físicas da membrana eritrocitária por modificar a composição, o empacotamento e a distribuição de seus lipídeos, o que conduz a uma alteração estrutural com redução de sua fluidez. Isto pode modificar a atividade de diversas proteínas da membrana e acelerar a senescência do eritrócito ou mesmo provocar sua remoção prematura da circulação (Cazzola *et al.*, 2003; Petibois e Délérís, 2005). Os agentes oxidantes podem converter os grupamentos tióis em componentes dissulfeto (R-SSG), levando à desnaturação das proteínas da membrana. Neste processo, pode ocorrer lesão intracelular com oxidação da hemoglobina (Hb) a metahemoglobina (meta-Hb) que precipita, formando corpos de inclusão eritrocitários denominados corpúsculos de Heinz (Ferreira e Matsubara, 1997; Feksa *et al.*, 2008). No corpo humano, 3% do total de hemoglobina (cerca de 750 g) são transformados por auto-oxidação. Essa reação, que produz meta-Hb e $O_2^{\bullet-}$, pode aumentar com o exercício (Belviranlı e Gökbıl, 2006; Finaud *et al.*, 2006). Os produtos da peroxidação dos componentes

lipídicos da membrana eritrocitária também podem induzir o estresse oxidativo intracelular. A associação dos fenômenos de oxidação dos grupamentos –SH, formação de corpúsculos de Heinz e lipoperoxidação poderão promover a lesão da membrana do glóbulo vermelho (Ferreira e Matsubara, 1997; Feksa *et al.*, 2008).

Durante exercícios ou treinamento físico exaustivos pode ocorrer a destruição de eritrócitos, não só pelos motivos anteriormente mencionados, mas também em decorrência da redução do volume do plasma. O deslocamento de água para fora do espaço vascular pode atuar como estresse químico, uma vez que a perda de água pelo sangue conduz à desidratação do eritrócito, geralmente como consequência da perda de potássio. A desidratação dos eritrócitos também é influenciada pelo fenômeno de isquemia/reperfusão. No entanto, em resposta ao estresse químico, o organismo libera renina, aldosterona e vasopressina (hormônio antidiurético ou ADH) e o resultado final é um aumento no volume plasmático (Carlson e Mawdsley, 1986; Eichner, 2002; Petibois e Délérís, 2005). A consequência imediata é a então chamada “anemia do esporte”, caracterizada por valores reduzidos de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito e alteração do volume celular médio (VCM) (Carlson e Mawdsley, 1986; Eichner, 1992; Eichner, 1996; Eichner, 1998; Fallon *et al.*, 1999; Eichner, 2002). Logo, pode ser evidenciada através do hemograma, pela redução de eritrócitos e por uma menor concentração de hemoglobina e de hematócrito no sangue (Schmidt *et al.*, 1988). Entretanto, a anemia esportiva é uma pseudoanemia, uma vez que a redução nos valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito ocorre como uma adaptação fisiológica aos exercícios extenuantes, sendo decorrente de uma hemodiluição provocada pelo aumento do volume plasmático (Carlson e Mawdsley, 1986; Eichner, 1992; Eichner, 1996; Eichner, 1998; Eichner, 2002). Como se trata de uma falsa anemia, a hemólise que ocorre com a prática de atividade física dificilmente causa anemia, sendo a ingestão deficiente de ferro a principal causa da verdadeira anemia em atletas, particularmente do sexo feminino (Vilardi *et al.*, 2001; Eichner, 2002).

1.5.4.2. Sistema imune e estresse oxidativo

Além de aumentar o consumo de oxigênio e induzir o estresse oxidativo como resultado da produção aumentada de RL, a atividade física exaustiva pode iniciar reações que se assemelham à fase aguda da resposta imune à infecção, induzindo liberação de proteínas de fase aguda e mudanças na contagem das células imunes (Santos-Silva *et al.*, 2001; Mooren *et al.*, 2002; Cazzola *et al.* 2003; Petibois e Délérís, 2004; Petibois e Délérís, 2005; Sureda *et al.*, 2005; Yusof *et al.*, 2007). Enquanto os neutrófilos aumentam após exercício exaustivo, a contagem de linfócitos diminui rapidamente, podendo esta alteração permanecer por diversas horas após o exercício. O treinamento moderado aumenta a função imune, mas o exercício exaustivo pode causar perturbações no sistema imune e depressão imunológica, aumentando o risco de infecções nas vias respiratórias superiores em decorrência da redução da função antiviral dos macrófagos

alveolares nos pulmões (Woods *et al.*, 2000; Peijie *et al.*, 2003; Mooren *et al.*, 2002; Sureda *et al.*, 2005).

Após o exercício exaustivo, inicialmente os neutrófilos e posteriormente os monócitos e os linfócitos são recrutados para o local de inflamação, onde produzem ERO e enzimas proteolíticas. A infiltração de neutrófilos é estimulada por fatores quimiotáticos, incluindo prostaglandinas, fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucinas (IL)-1 β e IL-6. Essas duas últimas citocinas são conhecidas por aumentar em resposta ao exercício. A IL-6 atua como mediador primário da reação de fase aguda, estimulando a produção hepática de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa (PCR) e inibidores de proteases. Também restringe a extensão da resposta inflamatória por ativar a síntese de citocinas antiinflamatórias e estimular a glândula hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que promove o aumento da liberação do hormônio cortisol pelo córtex adrenal (Cruzat *et al.*, 2007).

As alterações hormonais que acompanham o exercício e a geração de ERO podem inibir a proliferação de linfócitos, enquanto o dano oxidativo pode ativar processos apoptóticos nestas células (Sureda *et al.*, 2005). Diferentes estudos sugerem que os processos apoptóticos ativados nos linfócitos após exercício intenso contribuem para a regulação da resposta imune (Mooren *et al.*, 2002; Sureda *et al.*, 2005) e parecem estar relacionados ao status do treinamento e à intensidade do exercício (Peters *et al.*, 2006).

1.5.4.3. Plasma e estresse oxidativo

O aumento do metabolismo imposto pelo exercício promove acréscimo na produção de ERO, o que pode induzir dano oxidativo nos eritrócitos e no plasma, frações mais suscetíveis à peroxidação lipídica (Sureda *et al.*, 2005).

Em humanos, a maioria dos estudos realizados para investigar a peroxidação lipídica tem examinado a presença de peróxidos lipídicos ou de bioprodutos de peroxidação lipídica, tais como dieno conjugados, hidrocarbonetos lipídicos (hidrocarbonetos alifáticos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – HPAs) e substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), como o malonaldeído (MDA). O TBARS, cujos resultados são expressos geralmente como milimols (mmol) de equivalentes de MDA, tem sido a técnica mais amplamente utilizada para avaliar a peroxidação lipídica (Clarkson e Thompson, 2000). Alterações nas concentrações plasmáticas das vitaminas C e E e de glutatona oxidada (GSSG) têm sido também usadas para indicar aumento das reações oxidativas. Pensa-se que essas vitaminas antioxidantes podem ser mobilizadas dos tecidos para combater o estresse oxidativo em outra parte do corpo. O efluxo de GSSH para o plasma é considerado indicativo de estresse oxidativo, uma vez que a glutatona reduzida (GSH) é oxidada a GSSG nas células em resposta ao aumento de RL (Clarkson e Thompson, 2000).

Após o exercício exaustivo, também ocorrem alterações nas concentrações séricas de ferro e ferritina, na capacidade total de ligação do ferro e na saturação de transferrina. Apesar de tais alterações serem similares às aquelas encontradas na anemia crônica, apenas refletem a resposta de fase aguda (Fallon *et al.*, 1999).

Durante o exercício intenso, grande quantidade de ácido láctico pode ser produzida pelo músculo esquelético e liberada na circulação sanguínea para posterior remoção pelos tecidos periféricos. Os exercícios lactacidêmicos, ou seja, com intensidade de esforço acima da qual o lactato passa a se acumular na corrente sanguínea (limiar anaeróbio - LAn), têm também uma influência direta no nível de peroxidação de lipídios do plasma, por inibir o sistema de defesa antioxidante dos eritrócitos (Ribeiro *et al.*, 2004; Petibois e Délérís, 2005; Manchado *et al.*, 2006).

1.5.4.4. Lipoproteínas e estresse oxidativo

Existem evidências significativas do envolvimento de ERO na patogênese da aterosclerose. A modificação oxidativa de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) desempenha um papel fundamental na amplificação da resposta inflamatória, mediando uma variedade de processos imunes pró-inflamatórios que determinam a progressão da aterosclerose (Magnusson *et al.*, 1994; Steinberg, 1997; Santos-Silva *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Laufs *et al.*, 2005; Kiechl *et al.*, 2007). As ERO contribuem para o início e a progressão de lesões ateroscleróticas, ao favorecerem a infiltração e o acúmulo de lipídios no espaço subendotelial. ERO produzidas por células musculares lisas, endoteliais ou macrófagos podem modificar as LDL que, quando oxidadas, promovem o recrutamento de monócitos circulantes, o acúmulo de macrófagos residentes, a fagocitose acelerada e finalmente a formação de “células espumosas” (constituídas por macrófagos ricos em lipídeos) e estrias gordurosas, característicos das lesões iniciais (Steinberg, 1997; Santos-Silva *et al.*, 2001). Adicionalmente, estudos epidemiológicos sugerem que o aumento da viscosidade do sangue também está relacionado à aterogênese e ao risco cardiovascular (Santos-Silva *et al.*, 2001).

No contexto apresentado, exercícios físicos exaustivos e de alta intensidade podem favorecer a aterosclerose e o risco cardiovascular (Schneider e Oliveira, 2004), uma vez que têm sido associados com o aumento do estresse oxidativo no endotélio vascular (Laufs *et al.*, 2005; Petibois e Délérís, 2005) e com o aumento da viscosidade do sangue (Santos-Silva *et al.*, 2001). Apesar de exercícios prolongados estarem associados com uma pequena redução plasmática de triglicerídeos, que pode refletir o uso de LDL (lipoproteína rica em triglicerídeos) como combustível ou ser atribuída à redução da secreção hepática dessas lipoproteínas (Hardman, 1998), a inibição do sistema de defesa antioxidante dos eritrócitos pelo estresse químico induzido por exercícios de intensidade elevada (lactacidêmicos) pode favorecer a oxidação de LDL e, conseqüentemente, a aterosclerose (Santos-Silva *et al.*, 2001; Petibois e Délérís, 2005).

Por outro lado, evidências epidemiológicas indicam que a atividade física está associada com risco reduzido de doença coronariana e mortalidade decorrente de problemas cardiovasculares na meia idade (Wannamethee e Shaper, 2001). A atividade física moderada melhora a função endotelial, a capacidade de exercício e a colateralização da vascularização em pacientes com doença coronariana e previne a progressão da aterosclerose da carótida. Entre outros efeitos benéficos, o treinamento físico favorece a redução do peso (massa) corporal, melhora o humor, a pressão sanguínea e a sensibilidade à insulina (Wannamethee e Shaper, 2001; Laufs *et al.*, 2005). A longo prazo, exercícios moderados também favorecem o aumento da expressão (*upregulation*) das enzimas antioxidantes com consequente redução do estresse oxidativo (Laufs *et al.*, 2005).

1.5.5. DNA e estresse oxidativo

Uma vez que o metabolismo celular normal está bem estabelecido como fonte endógena de ERO e que estas espécies se relacionam com níveis basais de dano no DNA detectados em tecidos normais (Cooke *et al.*, 2003), o exercício exaustivo pode levar ao estresse oxidativo, o qual pode ser evidenciado pela detecção de produtos de peroxidação lipídica e de bases danificadas no DNA (Moller *et al.*, 2001; Mastaloudis *et al.*, 2004). De fato, tem sido mostrado que o exercício exaustivo induz dano no DNA de leucócitos circulantes (Nies *et al.*, 1996; Mastaloudis *et al.*, 2004; Demirbag *et al.*, 2006) e que pode induzir apoptose através de mecanismos diferentes tais como redução intracelular dos níveis de glutathione, alteração de proteínas mitocondriais ou danificando diretamente o DNA (Mooren *et al.*, 2002). Por outro lado, tem sido observado que a extensão dos danos no DNA de indivíduos treinados é pequena se comparada à de indivíduos não-treinados, sugerindo que a adaptação ao treinamento de resistência aeróbia pode reduzir os efeitos do estresse oxidativo, como danos no DNA (Nies *et al.*, 1996; Mastaloudis *et al.*, 2004; Schneider e Oliveira, 2004). Neste contexto, o teste do cometa pode ser usado para avaliar danos oxidativos no DNA induzidos pelo exercício (Mastaloudis *et al.*, 2004), uma vez que detecta quebras de fita simples e de fita dupla, sítios alcali-lábeis, sítios incompletos de reparo, ligação cruzada de DNA-DNA e de DNA-proteína em células individuais (Mastaloudis *et al.*, 2004; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005).

1.6. Polimorfismos genéticos relacionados ao estresse oxidativo

1.6.1. Polimorfismos das enzimas antioxidantes

As variações genéticas, sob a forma de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single-Nucleotide Polymorphism*) são encontradas em quase todos os genes humanos. Estima-se que uma mudança de base esteja presente, em média, a cada 300 nucleotídeos. Se a alteração conduz a um fenótipo perceptível, essas formas variantes são uma ferramenta atrativa

para investigar um possível efeito na doença em estudos da associação (Forsberg *et al.*, 2001a; Morgenstern, 2004).

Muitas variantes genéticas relacionadas ao estresse oxidativo e potencialmente significativas já foram identificadas, incluindo o polimorfismo Val9Ala na sequência-sinal mitocondrial da Mn-SOD, o polimorfismo –21A/T na região promotora da CAT, o polimorfismo Pro198Leu da GPX1, entre outros (Shimoda-Matsubayashi *et al.*, 1996; Forsberg *et al.*, 2001a; Knight *et al.*, 2004; Morgenstern, 2004; Flekac *et al.*, 2008). O efeito dessas variações ainda não está claramente esclarecido, porém grande parte dos polimorfismos resulta em níveis ou atividades alterados dessas enzimas, o que pode levar à redução da proteção contra o estresse oxidativo (Bastaki *et al.*, 2006).

1.6.1.1. Polimorfismo Val9Ala na sequência-sinal mitocondrial da Mn-SOD (NCBI, refSNP ID: rs1799725)

Apesar de ser de ocorrência mitocondrial, a MN-SOD (EC 1.15.1.1) é codificada por um gene nuclear localizado no cromossomo 6, loco 6q25.3 (Akyol *et al.*, 2004; Akyol *et al.*, 2005; Kinnula *et al.*, 2004; Bastaki *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2009). É sintetizada com uma sequência-sinal mitocondrial (hidrofóbica) que permite sua passagem através da membrana e, conseqüentemente, sua importação para a mitocôndria. Na matriz mitocondrial, a sequência-sinal é clivada e a proteína madura é montada em um tetrâmero ativo (Martin *et al.*, 2009).

No gene da Mn-SOD dois polimorfismos comuns na sequência-sinal mitocondrial – Val9Ala e Ala16Val – já foram identificados (Wang *et al.*, 2001); no entanto abordaremos apenas o polimorfismo Val9Ala, usado neste estudo. Shimoda-Matsubayashi *et al.* (1996) foram os primeiros a encontrarem a mutação no códon 9 da sequência-sinal mitocondrial, a qual envolve a substituição de uma timina (T) por uma citosina (C) e resulta na troca do aminoácido valina (Val - GTT) pelo aminoácido alanina (Ala - GCT). A substituição Val9Ala induz uma mudança conformacional na sequência-sinal mitocondrial, que passa de α -hélice para β -pregueada. Esta mudança conformacional vem sendo implicada na redução da eficiência do transporte da Mn-SOD para o interior da mitocôndria e na redução da formação do tetrâmero Mn-SOD ativo na matriz mitocondrial, o que diminui sua eficiência no combate ao estresse oxidativo (Shimoda-Matsubayashi *et al.* 1996; Ambrosone *et al.*, 1999; Akyol *et al.*, 2004; Oberley, 2005; Bica *et al.*, 2007).

Diversos estudos têm revelado associação entre a variante alélica –9Ala com doenças relacionadas ao estresse oxidativo e a mecanismos de defesa anormais contra os RL tais como doença esporádica do neurônio motor, esquizofrenia (Akyol *et al.*, 2005), degeneração macular exsudativa relacionada à idade (Kimura *et al.*, 2000), doença de Parkinson (Grasbon-Frodl *et al.*, 1999) e aumento do risco de cânceres de próstata, mama e ovário (Mitrinen *et al.*, 2001; Cai *et*

al., 2004; Olson *et al.*, 2004; Oberley, 2005; Taufer *et al.*, 2005; Slanger *et al.*, 2006; Bica *et al.*, 2007; Johnatty *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008).

1.6.1.2. Polimorfismo –21A/T na região promotora da CAT (NCBI, refSNP ID: rs7943316)

O gene da catalase humana consiste de 13 exons e está localizado no cromossomo 11, loco 11p13 (Kishimoto *et al.*, 1992; Forsberg *et al.*, 2001b; Bastaki *et al.*, 2006). Diversos SNPs já foram descritos para este gene (Góth *et al.*, 2004; Mak *et al.*, 2006; Flekac *et al.*, 2008), sendo a maioria associada com acatalasemia (Flekac *et al.*, 2008), condição caracterizada por uma deficiência de catalase nos eritrócitos e que apresenta como manifestações clínicas gangrena oral, alteração do metabolismo de lipídios, carboidratos e homocisteína e aumento do risco de diabetes mellitus (Góth *et al.*, 2004). Esses polimorfismos encontram-se distribuídos ao longo de todo o gene, incluindo região promotora, íntrons e éxons (Forsberg *et al.*, 2001b; Ahn *et al.*, 2005; Bastaki *et al.*, 2006; Gavalas *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006).

Associações de polimorfismos do gene da CAT com diabetes mellitus, hipertensão, vitiligo e doença de Alzheimer têm sido investigadas (Góth *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2007). Entretanto, mutações benignas na região não-codificadora 5', como o polimorfismo –21A/T, não reduzem a atividade da catalase e não têm sido associadas com doenças (Góth *et al.*, 2004; Mak *et al.*, 2006). O polimorfismo citado ocorre dentro da região promotora e resulta na substituição de uma adenina por uma timina na posição –21 à montante do sítio de iniciação da transcrição (Góth, 1998; Flekac *et al.*, 2008).

1.6.1.3. Polimorfismo Pro198Leu da GPX1 (NCBI, refSNP ID: rs1050450)

A família glutathione peroxidase é a maior das famílias gênicas de selenoproteínas e inclui os genes GPX1, GPX2, GPX3 e GPX4, cuja expressão varia entre os diferentes tecidos (Foster *et al.*, 2006).

O gene da GPX1 é composto por 2 exons e ocupa uma região de 1,42 Kb no cromossomo 3, loco 3p21.3 (Bastaki *et al.*, 2006; Shinkai *et al.*, 2006). Nesse gene vários polimorfismos já foram descritos (Knight *et al.*, 2004), incluindo o polimorfismo Pro198Leu, o qual decorre da substituição de uma citosina por uma timina no códon 198 (inicialmente atribuído incorretamente ao códon 197), resultando na troca do aminoácido prolina pelo aminoácido leucina (Knight *et al.*, 2004). Alguns estudos têm indicado que a variante Leu afeta a atividade da enzima GPX1, que se torna menos responsiva à estimulação (Hu e Diamond, 2003; Zhao *et al.*, 2005; Shinkai *et al.*, 2006).

Estudos também têm revelado associação entre a variante Leu com risco aumentado de alguns tipos de câncer (Ratnasinghe *et al.*, 2000; Hu e Diamond, 2003; Ichimura *et al.*, 2004; Ravn-Haren *et al.*, 2006). No entanto, estas correlações não foram observadas consistentemente em todas as populações (Foster *et al.*, 2006), uma vez que a frequência do alelo Leu varia com o grupo étnico (Ratnasinghe *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2005).

1.6.2. Polimorfismo da haptoglobina (Hp)

Dois locos gênicos foram inicialmente envolvidos na síntese de Hp, um para a síntese das cadeias α e outro para a síntese das cadeias β . Evidências posteriores demonstraram o envolvimento de um único loco, 16q22.1. As cadeias α são responsáveis pelo polimorfismo da Hp, que se manifesta através dos fenótipos principais Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2. O gene $\text{Hp}\alpha$ consiste de três alelos estruturais $\text{Hp}\alpha^{1F}$, $\text{Hp}\alpha^{1S}$ e $\text{Hp}\alpha^2$ e possui 5 exons que codificam os alelos 1 e 7 exons que codificam o alelo 2. O alelo $\text{Hp}\alpha^2$, presente apenas em humanos, teve sua origem em eventos de duplicação intragênica dos exons 3 e 4 (~1.700 pb) a partir da fusão por *crossing-over* desigual de um alelo Hp^{1F} com outro Hp^{1S} em heterozigotos $\text{Hp}^{1F}/\text{Hp}^{1S}$. Posteriormente, *crossing-over* entre Hp^2 e Hp^{1F} ou Hp^{1S} em indivíduos Hp^1/Hp^2 produziu Hp^{2FF} , Hp^{2SS} e Hp^{2FS} , cuja mobilidade eletroforética é idêntica (Langlois e Delanghe, 1996; Yano *et al.*, 1998; Langlois *et al.*, 1997; Wassel, 2000; Melamed-Frank *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2003; Levy, 2004; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004; Tseng *et al.*, 2004; Carter e Worwood, 2007). Entretanto, como apresentam pontos isoelétricos diferentes, podem diferenciadas por eletroforese bidimensional de alta resolução em gel de poliacrilamida-SDS (Borresen *et al.*, 1987).

Em decorrência de apresentarem diferenças na concentração plasmática e extra-vascular de haptoglobina e nas capacidades antioxidante e antiinflamatória, os fenótipos Hp apresentam consequências clínicas diferentes e têm sido associados com maior resistência ou maior predisposição a várias doenças (Langlois e Delanghe, 1996; Yano *et al.*, 1998; Wassel, 2000; Koch *et al.*, 2003; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004; Tseng *et al.*, 2004; Carter e Worwood, 2007). O fenótipo Hp 2-2, por exemplo, é super-representado em pacientes com doenças auto-imunes, epilepsia, psicoses afetivas e abuso de álcool e drogas, além de estar associado com o risco aumentado de desenvolvimento de neuropatia, retinopatia e doenças cardiovasculares (DCV) em pacientes diabéticos e de pré-eclâmpsia durante a gestação e ser considerado como maior fator de risco para doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Sua associação com lesões ateroscleróticas e DCV tem sido estudada extensivamente. Já o fenótipo 1-1 tem sido associado com a resistência a essas doenças. Por outro lado, o fenótipo 1-1 é super-representado em pacientes com certos tipos de câncer, enquanto o fenótipo Hp2-2 apresenta menor frequência (Langlois e Delanghe, 1996; Langlois *et al.*, 1997; Wassel, 2000; Melamed-Frank *et al.*, 2001; Bernard *et al.*, 2002; Awadallah, 2003; Janaydeh *et al.*, 2004; Levy, 2004; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004; Tseng *et al.*, 2004).

Além dos fenótipos principais, diversas variantes Hp têm sido identificadas e já foram fornecidas evidências de evolução gênica através de duplicação por *crossing-over* desigual e subsequente mutação independente (OMIM *140100). Alterações na cadeia polipeptídica β , alelo $H\alpha^2$ triplicado, Hp2-1 modificado, duplicação do gene $H\alpha^1$, deleção alélica no gene Hp levando à deficiência congênita de haptoglobina (anhaptoglobinemia) são alguns exemplos (OMIM *140100; Langlois e Delanghe, 1996; Delanghe *et al.*, 1998; Koda *et al.*, 1998; Koda *et al.*, 2000).

1.7. Dieta com antioxidantes contra o estresse oxidativo

Estudos epidemiológicos e experimentais apontam para um mesmo lado, de que as dietas ricas em vegetais e, portanto em antioxidantes, estão associadas com risco reduzido de se contrair câncer (Borek, 2004). Muitos estudos indicam que alguns nutrientes antioxidantes como as vitaminas A, C e E minimizam os efeitos tóxicos produzidos pelas drogas antineoplásicas e interferem positivamente na resposta ao tratamento empregado (Liu *et al.*, 2003; Borek, 2004; Berger, 2005). Do mesmo modo, a suplementação com antioxidantes, através do aumento da ingestão de frutas e vegetais ricos nesses compostos, diminui as lesões oxidativas no DNA e a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), prevenindo a ocorrência de câncer, aterosclerose e outras doenças degenerativas (Kong e Lillehei, 1998; Santos e Cruz, 2001; Dusinská *et al.*, 2003). Estudos clínicos e epidemiológicos têm também apresentado evidências de que antioxidantes fenólicos de vegetais contribuem para a baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas contêm altos teores desses elementos (Bianchi e Antunes, 1999; Degáspari e Waszczynskyj, 2004; Kuskoski *et al.*, 2006).

Entretanto, o uso de suplementos nutricionais com propriedades antioxidantes é controverso, sendo uma questão polêmica e objeto de divergência entre autores. Compostos com propriedades antioxidantes podem ter efeito antioxidante ou pró-oxidante, dependendo da dose. Enquanto em níveis nutricionais parecem ter um efeito protetor, em doses altas podem ter efeitos deletérios (Panayiotidis e Collins, 1997; Hercberg *et al.*, 1998; Antunes e Takahashi, 1999; Collins, 2001; Paolini *et al.*, 2003; Hercberg *et al.*, 2006).

Guarnieri *et al.* (2007), observaram que a ingestão de uma única porção de suco laranja protegeu as células mononucleares do sangue contra dano oxidativo no DNA. Porém, este efeito protetor não foi observado depois da ingestão de vitamina C, indicando que a proteção antioxidante do suco laranja não foi decorrente apenas da vitamina C e que outros fitoquímicos podem estar envolvidos, e sugerindo que alimentos integrais podem aumentar a resistência ao estresse oxidativo de forma mais eficiente do que compostos isolados.

Diante do contexto apresentado, a importância da pesquisa com antioxidantes naturais tem aumentado muito nos últimos anos. Desde a década de 1980 houve um aumento considerável da busca por antioxidantes naturais que podem ser incluídos na dieta como substitutos para antioxidantes sintéticos (Degáspari e Waszczynskyj, 2004).

1.7.1. Antioxidantes contra o estresse oxidativo induzido por exercícios

Antioxidantes biológicos desempenham um papel fundamental na proteção contra o estresse oxidativo induzido por exercícios. A deficiência ou depleção desses antioxidantes tem sido associada com dano tissular exacerbado, enquanto a suplementação com antioxidantes tem gerado resultados variáveis (Ji, 1995). Muitos estudos têm investigado o impacto do estado antioxidante nos danos oxidativos induzidos pelo exercício (Ji, 1995) e com esta finalidade, a maioria das intervenções tem focado em fatores nutritivos tais como vitaminas antioxidantes ou fármacos que servem como mediadores do estresse oxidativo (Alessio *et al.*, 2002). Considerando que ERO podem atuar como sinais que regulam eventos moleculares de adaptação celular ao exercício, a consequência prática é que a administração de antioxidantes pode impedir tais adaptações quando o exercício é moderado, uma vez que este tipo de exercício aumenta a expressão das enzimas antioxidantes e desta forma, funciona como antioxidante. Portanto, a recomendação do uso de suplementos antioxidantes deve ser feita apenas para aqueles casos de exercícios exaustivos que causam estresse oxidativo e dano celular (Ji e Leichtweis, 1997; Gomez-Cabrera *et al.*, 2008). A fim de reduzir os efeitos promovidos pelo exercício extenuante, as alternativas nutricionais mais estudadas incluem a suplementação com vitamina E, vitamina C, creatina e glutamina (Clarkson e Thompson, 2000; Cruzat *et al.*, 2007).

Os diversos estudos que examinaram os efeitos da suplementação antioxidante usaram como medidas de resultado o desempenho atlético e/ou mudanças no estresse oxidativo (Urso e Clarkson, 2003). Diferentes pesquisas demonstraram que a suplementação com vitamina E, creatina e glutamina podem atenuar o estresse oxidativo ou reduzir a quantidade de lesões celulares decorrentes de exercícios físicos exaustivos. Outros compostos como a vitamina C tiveram pouco ou nenhum efeito; todavia, a redução dos estoques corporais de vitamina C pode contribuir com o aumento do estresse oxidativo (Cruzat *et al.*, 2007). Entretanto, nenhum estudo examinou isoladamente o papel antioxidante dos diversos carotenóides na proteção contra danos oxidativos induzidos pelo exercício e somente o β -caroteno (30 mg) já foi usado em uma mistura com as vitaminas C (1.000 mg) e E (592 mg) (Kanter *et al.*, 1993; Clarkson e Thompson, 2000; Urso e Clarkson, 2003; Cruzat *et al.*, 2007).

Considerando que os carotenóides apresentam alta capacidade antioxidante (Hermes-Lima, 2004; Gomes *et al.*, 2005), especialmente em condições de baixa tensão de O_2 (Ferreira e Matsubara, 1997; Gomes *et al.*, 2005), a suplementação com óleo de pequi pode prevenir danos

oxidativos induzidos por exercícios para aqueles atletas que se exercitam ativamente e ultrapassam suas defesas antioxidantes ou que nasceram geneticamente menos favorecidos para o sistema de defesa antioxidante, uma vez que contém os carotenóides β -caroteno, licopeno, ζ -caroteno, criptoflavina, β -criptoxantina, anteraxantina, zeaxantina, mutatoxantina, violanxantina, luteína e neoxantina (Ramos *et al.*, 2001; Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, 2004; Lima *et al.*, 2007).

2. HIPÓTESE

1. Uma vez que a composição química da polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) descrita na literatura revela a presença de vários compostos com potencial antioxidante, os extratos obtidos a partir da polpa podem ser capazes de proteger as células contra:
 - 1.1. mutações induzidas por agentes químicos;
 - 1.2. danos celulares e no DNA decorrentes do estresse oxidativo induzido pelo exercício.

O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, processo nº 25000.001668/2005-18 (Anexo I).

3. OBJETIVOS

1. Pesquisar o melhor método de obtenção dos extratos da polpa do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).
2. Realizar testes pré-clínicos e de segurança toxicológica em camundongos.
3. Verificar os efeitos antioxidantes e fitoterápicos de extratos da polpa do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em voluntários humanos atletas (corredores de rua).
4. Verificar se o polimorfismo das enzimas antioxidantes (Mn-SOD, CAT e GPX1) e da haptoglobina influenciam na resposta dos atletas à suplementação com o óleo de pequi.
5. Testar a aceitabilidade desse suplemento antioxidante natural pela população de atletas estudados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção do material botânico e dos extratos

4.1.1. Obtenção do material botânico

O pequi *in natura* foi adquirido no comércio local de Brasília e entorno durante os períodos de safra compreendidos entre novembro/2006 a fevereiro/2007 e novembro/2007 a fevereiro/2008. O mesocarpo interno dos frutos foi descascado ou ralado para a obtenção da polpa, que foi acondicionada em vasilhames de plástico com tampa e congelada a -86°C até o momento da produção dos extratos.

4.1.2. Obtenção dos extratos

4.1.1.1. Verificação do melhor sistema para extração

Foram testados os seguintes sistemas de extração: (1) com aquecimento em aparelho soxhlet sob atmosfera de argônio; (2) maceração a frio por 24 horas; (3) infusão. Todos os procedimentos foram realizados em sistemas fechados e protegidos da luz.

4.1.1.2. Verificação do rendimento-massa

Foram usados 200 mL de solvente para cada 100g de polpa a ser extraída, sendo testados cinco solventes: água destilada, para obtenção do extrato aquoso (EAP); etanol, para obtenção do extrato etanólico (EEP); água destilada e etanol (1:1), para obtenção do extrato hidro-etanólico (EHEP); clorofórmio e n-hexano, para obtenção da fase orgânica (óleo de pequi), cujos extratos foram inicialmente denominados de extrato clorofórmico (ECP) e extrato hexânico (EHP).

O extrato aquoso foi obtido por infusão, enquanto os demais extratos, por maceração a frio. Os extratos obtidos foram submetidos à evaporação sob pressão reduzida em rota-evaporador, seguida de evaporação em bombas de alto vácuo. O rendimento-massa foi verificado e os extratos foram imediatamente congelados em freezer a -86°C .

Após cada extração, uma alíquota de 2,0 mL foi enviada para o Instituto de Química da Universidade de Brasília, para análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN); o extrato clorofórmico também foi submetido à análise por Cromatografia Gasosa (Anexo II).

4.2. Testes pré-clínicos e toxicológicos em camundongos

Como testes de segurança toxicológica *in vivo* foram usados a pesquisa de micronúcleos, que avalia quebras cromossômicas (danos de fita dupla) e o teste do cometa, que também avalia danos de fita simples no DNA. Estes testes também foram usados para verificar se os extratos de pequi são capazes de proteger as células contra mutações induzidas pelos agentes quimioterápicos Bleomicina e Ciclofosfamida. Posteriormente o teste de TBARS foi utilizado para verificar diferenças no nível de peroxidação lipídica do plasma. Os resultados foram publicados na Revista *Genetics and Molecular Biology* (Anexo III).

4.2.1. Quimioterápicos

A Bleomicina (CAS 011056-06-7) foi obtida na forma de sulfato estéril (Blenoxane) (Bristol-Myers Company) e a Ciclofosfamida (CP: CAS 6055-19-2), na forma de Genuxal (ASTA Medica Laboratory).

4.2.2. Extratos de pequi

Foram usados os extratos aquoso e clorofórmico (aqui denominado de extrato orgânico de pequi ou EOP), sendo ambos obtidos por aquecimento em aparelho soxhlet sob atmosfera de argônio. A escolha dos extratos e do método de extração foi baseada no trabalho de *Khoury et al.* (2007) e no rendimento-massa obtido neste trabalho.

4.2.3. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss albino de ambos os sexos, procedentes da Bioagri Laboratórios (Planaltina/DF), com 60 a 120 dias de vida e massa corporal de aproximadamente $30\text{g} \pm 2\text{g}$. Os camundongos foram alojados em caixas plásticas devidamente etiquetadas, sendo mantidos à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e com livre acesso ao alimento e à água.

4.2.4. Teste do micronúcleo (MN)

Para a pesquisa de micronúcleos foi utilizado apenas o extrato orgânico do pequi (EOP), uma vez que o extrato aquoso foi testado previamente por *Khoury et al.* (2007).

Camundongos de ambos os sexos foram randomizados em doze grupos (M1 a M12), contendo oito animais/grupo. O EOP foi administrado diariamente durante 10 dias por via oral

(v.o.) através de gavagem nas concentrações de 0,5 e 1 mL kg⁻¹ de massa corporal (correspondentes a 15µL e 30µL, respectivamente), sozinho ou em combinação com uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de Bleoxina (BLM) ou Ciclofosfamida (CP) (para concentrações, olhar Tabela 12 – itens resultados). A BLM foi diluída em solução salina a 0,9%, enquanto a CP foi diluída em água destilada. O grupo controle recebeu água filtrada no lugar do EOP e nenhum quimioterápico foi administrado. Os experimentos foram programados para testar dois grupos de cada vez e, de acordo com os resultados obtidos, foram feitas alterações nas dosagens do EOP e nas concentrações dos quimioterápicos utilizados (Tabela 12 – item resultados).

As lâminas de células da medula óssea foram preparadas de acordo com o protocolo proposto por Schmid (1975), com modificações. Após o tratamento, os animais foram sacrificados por meio de deslocamento cervical e as células da medula óssea foram imediatamente removidas do fêmur para um tubo Falcon, utilizando uma seringa de insulina contendo 1 mL de soro fetal bovino (Difco). O excesso de sobrenadante foi retirado após centrifugação a 800-1000 r.p.m durante 10 minutos, as células foram homogeneizadas por agitação em vórtex e duas lâminas por animal foram preparadas e coradas de acordo com o método Giemsa. Um total de 2.000 eritrócitos foi contado por animal, sendo 1.000 policromáticos (EPC) e 1.000 normocromáticos (ENC). Foram avaliadas a frequência de micronúcleos em cada tipo de eritrócito e a taxa de eritrócitos policromáticos em relação aos eritrócitos totais.

Os testes estatísticos foram conduzidos através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância < 0,05.

4.2.5. Eletroforese em gel de célula única – Teste do Cometa

Foi realizado após a pesquisa de micronúcleo, utilizando as dosagens mais adequadas dos extratos orgânico (EOP) e aquoso (EAP) verificadas, respectivamente, neste experimento e por Khouri *et al.* (2007). A concentração de BLM usada, de 25 mL kg⁻¹ de massa corporal, foi definida neste trabalho após os experimentos de análise de micronúcleo. Foram utilizados nove grupos randomizados de oito camundongos de ambos os sexos (C1 a C9) e os tratamentos seguiram o mesmo padrão do teste de MN (Tabela 13 – item resultados).

O teste do cometa foi feito segundo metodologia proposta por Singh *et al.* (1988), com pequenas modificações. Lâminas de microscópio de extremidade fosca foram mergulhadas em 1,5% de agarose ponto de fusão normal (NMA) em solução salina PBS e colocadas para secar a temperatura ambiente. Subsequentemente, retirou-se 20 µL de sangue periférico da cauda de cada camundongo e transferiu-se para um eppendorf contendo 120 µL de 0,5% de agarose baixo ponto de fusão (LMA da Gibco BRL) em solução salina PBS a 37°C. Essa mistura foi então distribuída nas lâminas (2 lâminas/animal). Cada lâmina foi coberta por lamínula e colocada para secar a 4°C durante 10 minutos. Após solidificação, as lamínulas foram removidas e as lâminas

foram mergulhadas em solução de lise fresca contendo 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris (pH ajustado para 10,0 com NaOH), 1% de N-lauroil sarcosina, 1mL de Triton X-100 e 10 DMSO. A solução de lise fresca foi preparada a partir de uma solução-estoque contendo NaCl 2,5M; EDTA 100mM e Tris 10mM. Protegidas da luz, as lâminas permaneceram nessa solução, mantidas a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese e submersas em tampão alcalino (300mM NaOH and 1mM EDTA, pH > 13.0) recém-preparado e mantido a 4°C. Após 30 minutos de submersão neste tampão, procedeu-se com a eletroforese a 250V, 350mA a 4°C durante 40 minutos. A seguir, as lâminas foram transferidas para uma cuba contendo tampão de neutralização (0.4M Tris-HCl; pH 7.5). A cada 5 minutos, as lâminas eram retiradas do tampão, permanecendo a temperatura ambiente durante 5 minutos e depois retornando por mais 5 minutos ao tampão, e assim sucessivamente, num total de 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas para secar a temperatura ambiente durante 1 hora e foram posteriormente fixadas em etanol 100% por 5 minutos. Após secagem, as lâminas foram guardadas a 4°C até o momento de uso. Todas as etapas foram realizadas em ausência de luz direta (penumbra) para evitar danos adicionais no DNA. O processo de coloração foi feito com brometo de etídio a 20µg/mL. A avaliação visual foi feita através de um microscópio de fluorescência Axioskope 2 da Zeiss, filtro de 510-560 nm, barreira de filtro de 590 nm e aumento total de 400x, utilizando-se as 5 classes propostas por Collins (1995) e o índice de danos no DNA foi calculado de acordo com Jaloszyński *et al.* (1997).

O índice de danos (ID) no DNA foi analisado pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com um nível de significância < 0,05.

4.2.6. Teste de TBARS

Este teste foi usado para avaliar o estresse oxidativo decorrente da ação de ERO sobre as membranas celulares, através da quantificação de adutos MDA-TBA (malonaldeído-ácido tiobarbitúrico) (Wasowicz *et al.*, 1993).

Para o teste de TBARS foram usados seis grupos randomizados de quatro camundongos cada, sendo três deles formados apenas por machos e os outros três apenas por fêmeas (T1 a T6). Quatro grupos foram submetidos ao tratamento via oral (gavagem) com extrato de pequi e dois grupos foram usados como controle, como a seguir:

- T1– Controle fêmea (água filtrada v.o. durante 10 dias)
- T2– Controle macho (água filtrada v.o. durante 10 dias)
- T3– Fêmeas tratadas com EOP v.o. (0.5 mL kg⁻¹ durante 10 dias)
- T4– Machos tratados com EOP v.o. (0.5 mL kg⁻¹ durante 10 dias)
- T5– Fêmeas tratadas com EAP v.o. (1.0 mL kg⁻¹ durante 10 dias)
- T6– Machos tratados com EAP v.o. (1.0 mL kg⁻¹ durante 10 dias)

O teste de TBARS foi realizado segundo metodologia usada por Wasowicz *et al.* (1993). A solução de TBA foi preparada dissolvendo-se TBA (Merck) em ácido acético (Merck) para uma concentração final de TBA 29 mmol/L, ácido acético 8,75 mol/L. A solução-estoque de MDA foi preparada dissolvendo-se 480 µL de 1,1,3,3-tetraethoxypropano (Sigma) em 100 mL de etanol (Merck). No momento de uso, esta solução foi diluída em água milli-Q para produzir uma solução de trabalho de MDA de 10 µmol/L.

O sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca com uma seringa contendo EDTA como anticoagulante. Após centrifugação a 4°C por 10 min. a 1500 x g, o plasma foi cuidadosamente removido e transferido para microtubos de 1,5 mL contendo EDTA e GSH nas concentrações finais de 1,34 e 0,65 mmol/L, respectivamente. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -86°C até o momento de uso. Para o teste de TBARS, 50 µL de plasma ou volume adequado de solução de trabalho de MDA (curva-padrão) foi introduzido em tubos de 10 mL contendo 1 mL de água milli-Q. A seguir, foi adicionada a solução de TBA em ácido acético (29 mmol/L e 8,75 mol/L, respectivamente; pH da solução 2,4-2,6). O conteúdo dos tubos foi agitado e os tubos foram colocados em banho-maria a 95°-100°C durante 1 hora. Após o resfriamento das amostras à temperatura ambiente, foram adicionados 25 µL de HCl 5 mol/L e 3,0 mL de butanol. Os tubos foram agitados em vórtex por 5 segundos e a fase alcoólica foi separada por centrifugação a 1.500 x g durante 10 minutos. A leitura da fluorescência da fase alcoólica foi feita no equipamento Espectrofluorometer FP-777 (JASCO), utilizando-se os comprimentos de onda 525 nm para excitação e 547 nm para emissão. A curva-padrão foi preparada com soluções de MDA de 0-0,15 nmol/mL.

A quantificação de adutos MDA-TBA, em nm/mL, foi analisada pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com um nível de significância < 0,05.

4.3. Testes com voluntários atletas

Esta etapa visou avaliar os efeitos antioxidantes e fitoterápicos do extrato orgânico de pequi (EOP), aqui denominado de óleo de pequi, na lipemia pós-prandial, na pressão arterial e contra danos celulares e no DNA decorrentes do estresse oxidativo induzido pelo exercício. Para tal, foram firmados contratos de parceria com as empresas Farmacotécnica e Laboratório Sabin de Análises clínicas Ltda/Núcleo de Apoio à Pesquisa. À empresa Farmacotécnica coube o encapsulamento do óleo de pequi. O Laboratório Sabin foi responsável pela aferição da pressão arterial dos atletas, coleta do sangue e exames laboratoriais.

4.3.1. Procedimentos de extração da polpa do pequi e preparação das cápsulas

A polpa do pequi foi extraída por maceração a frio, usando clorofórmio como solvente. O extrato obtido foi submetido à evaporação sob pressão reduzida em rota-evaporador, seguida de evaporação em bombas de alto vácuo e imediatamente encaminhado à empresa farmacêutica de manipulação Farmacotécnica para ser encapsulado. O óleo do pequi foi incorporado em q.s.p. de Aerosil (dióxido de silício coloidal), de forma que os usuários ingerissem uma dose diária de 400 mg. A produção das cápsulas foi patenteada com o número PI0601631-6 (Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico – CDT/UnB).

4.3.2. Desenho experimental

Voluntários corredores de rua (n=125) de ambos os sexos (76 homens e 49 mulheres) e de diferentes faixas etárias (15 a 67 anos) foram recrutados em escolas de ensino médio, faculdades, Universidade de Brasília (UnB), Polícia Civil (PCDF), clubes, grupos de dança e empresas de Brasília (Distrito Federal). Os testes foram realizados ao ar livre e em terreno plano após corridas de 4, 5, 6, 7, 8, 10, 16, 19 ou 21 Km, dependendo do condicionamento físico do atleta. Como critérios de seleção, os voluntários deveriam correr no mínimo 4 Km e participar de duas corridas de mesma distância, antes (grupo controle) e depois (grupo de tratamento) da ingestão diária de 400 mg de óleo de pequi em cápsulas durante 14 dias consecutivos. A escolha da ingestão diária levou em consideração a dose diária máxima de carotenóides recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e os dados da literatura sobre o pequi.

Os voluntários foram informados sobre o propósito do estudo e todos eles assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - Anexo IV e V), bem como preencheram um questionário sobre seus hábitos e estilos de vida, doenças crônicas pré-existentes, histórico familiar de doenças crônicas, existência de infecção/inflamação e estresse psicossocial (Anexo VI). Os participantes foram randomizados e receberam um número (senha α -numérica), a fim de manter sua privacidade. Todos tiveram acesso aos resultados de seus exames e ficaram livres para desistir do estudo a qualquer tempo. Dos 139 atletas que participaram da primeira corrida, 125 concluíram sua participação. Após a primeira corrida, os atletas receberam as cápsulas de pequi e foram instruídos para ingeri-las por 14 dias consecutivos durante ou imediatamente depois do almoço, começando no dia da primeira corrida e finalizando na véspera da segunda corrida.

Todos os participantes tiveram sua pressão arterial aferida antes de cada corrida. Imediatamente após o término das corridas, coletou-se o sangue de cada atleta para a realização dos exames no laboratório de genética da UnB e no Laboratório Sabin. Ao laboratório de genética da UnB coube a genotipagem da haptoglobina e das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX1 e os testes do cometa e de TBARS. Os laboratórios Sabin ficaram responsáveis pela realização dos

seguintes exames: hemograma completo, perfil lipídico e dosagens séricas de TGO, TGP, CPK e PCR-US.

O material biológico encontra-se estocado no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, responsável pela guarda das amostras, cujo local é de acesso restrito somente aos pesquisadores envolvidos no projeto.

4.3.3. Coleta de sangue

Após cada corrida, foram coletados 20 mL de sangue de cada atleta, utilizando-se agulhas descartáveis estéreis e tubos Vacutainer (4 mL/tubo) devidamente identificados com o número da amostra. Foram usados dois tubos para sangue total contendo EDTA e três tubos SST gel para análise química de soro. Desses, um tubo para sangue total e um tubo para soro foram encaminhados ao laboratório de genética, sendo o restante encaminhado aos Laboratórios Sabin.

4.3.4. Teste do Cometa

Para o teste do cometa (Singh *et al.*, 1988) algumas alterações foram feitas, em relação ao protocolo usado para camundongos. Foram misturados em microtubos 120 µL de sangue total em 720 µL de 0,5% de agarose baixo ponto de fusão (LMA da Gibco BRL) em solução salina PBS a 37°C para a confecção de seis lâminas/amostra. Após solidificação e remoção das lamínulas, duas lâminas foram mergulhadas em solução de lise fresca (controle). As outras lâminas foram tratadas com H₂O₂ nas concentrações de 250 µM e 1 mM (2 lâminas/tratamento), colocadas sob refrigeração por 5 minutos e só então mergulhadas em solução de lise fresca após remoção das lamínulas. A eletroforese foi realizada a 250 V, 300 mA a 4°C durante 40 minutos.

4.3.5. Teste de TBARS

O teste de TBARS seguiu a mesma metodologia usada para camundongos (Wasowicz *et al.* 1993).

4.3.6. Preparação do sangue para genotipagem da haptoglobina e enzimas antioxidantes

O sangue total foi centrifugado a 1.500 x g 4°C durante 10 minutos. Com a ajuda de uma pipeta Pasteur o plasma foi cuidadosamente removido e transferido para microtubos de 2 mL contendo EDTA e GSH nas concentrações finais de 1,34 e 0,65 mmol/L, respectivamente. As

amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -86°C até o momento de uso. Subsequentemente, o *buffy coat* (fração leucocitária) foi transferido para novos microtubos de 2 mL previamente etiquetados, que receberam igual volume de tampão de estocagem de eritrócitos (0,0598 M citrato trissódico; 0,02 M NaH_2PO_4 ; 0,0197 M Na_2HPO_4 ; 40% glicerol; pH 7,1). Após homogeneização, armazenou-se em freezer -20°C . O mesmo procedimento foi realizado com a papa de hemácias.

4.3.7. Extração de DNA

Foi feita a partir do *buffy coat* (fração leucocitária) por kits de extração GFXTM da Amersham Biociences, de acordo com as especificações do fabricante. Os DNAs extraídos foram quantificados em gel de agarose por comparação visual com padrões previamente quantificados em espectrofotômetro, e congelados em freezer -20°C até o momento de uso.

4.3.8. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e RFLP (polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição)

A amplificação dos fragmentos de DNA foi feita por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), usando-se um termociclador MJ PTC-100 (MJ. Research Inc.). A Tabela 4 apresenta as concentrações e quantidade de reagentes que foram empregados nas PCRs dos polimorfismos estudados. As sequências dos iniciadores e as enzimas de restrição que foram utilizadas nas análises dos polimorfismos das enzimas antioxidantes são mostradas na Tabela 5. As Tabelas 6 e 7 apresentam, respectivamente, a sequência de iniciadores e os pares de iniciadores específicos que foram usados na análise do polimorfismo da cadeia $\text{Hp}\alpha$ da haptoglobina.

Tabela 4 – Concentrações e quantidade de reagentes (em µl) empregados nas PCRs dos polimorfismos estudados.

Reagentes	Quantidade por amostra			
	Haptoglobina	Mn-SOD	CAT	GPX1
H ₂ O ^a	8,06	12,60	12,60	7,11
Tampão 10X ^b	1,57	2,55	2,55	1,25
dNTP ^c	1,25	1,50	1,50	0,31
Iniciadores ^d	0,50	1,30	1,30	1,25
MgCl ₂ (50 mM)	0,63	0,70	0,70	0,13
Taq polimerase ^e	0,08	0,15	0,15	0,20
Total	12,09	18,80	18,80	11,50
DNA (25ng/µl)	*	*	*	*

^aágua destilada, deionizada e autoclavada; ^btampão com MgCl₂ 2 mM fornecido pelo fabricante da Taq DNA Polimerase; ^c10 mM; ^d0,2 µM de cada iniciador; ^e5 U/µl; *variou de acordo com a quantificação do DNA.

Tabela 5 – Sequência de iniciadores e enzimas de restrição utilizadas nas análises dos polimorfismos estudados de Mn-SOD, CAT e GPX1.

Marcador	Sequência do <i>primer</i> ou iniciador	Referência	Enzima de Restrição
Mn-SOD			
Sense	5' ACCAGCAGGCAGCTGGCGCCGG 3'	Mitrunen <i>et al.</i> , 2001	Ngo MIV
Antisense	5' GCGTTGATGTGAGGTTCCAG 3'		
CAT			
Sense	5' AATCAGAAGGCAGTCCTCCC 3'	Ukkola <i>et al.</i> , 2001	Hinf I
Antisense	5' TCGGGGAGCACAGAGTGAC 3'		
GPX1			
Sense	5'AGCCCAACTTCATGCTCTTC 3'	Zhao <i>et al.</i> , 2005	Apa I
Antisense	5'CAGGTGTTCCCTCCCTCGTAG 3'		

4.3.8.1. Genotipagem da Mn-SOD – Polimorfismo Val9Ala na sequência-sinal mitocondrial (NCBI, refSNP ID: rs1799725)

As condições de PCR envolveram uma desnaturação inicial do DNA a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação a 95°C por 1 minuto, 61°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 2 minutos (extensão) e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. O produto amplificado de 107 pb foi digerido com a endonuclease *Ngo* MIV a 37°C durante 4 horas (Tabela 6) e os fragmentos

de restrição foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante, a 150 V, 20-30 mA, durante 2 horas e coloração com nitrato de prata.

Tabela 6 – Concentrações e quantidade de reagentes empregados na digestão dos produtos da PCR de Mn-SOD com *Ngo* MIV.

Reagente	Quantidade por tubo (μL)
Água milli-Q	12,3
Tampão 10X	2,0
BSA Acetilado	0,2
<i>Ngo</i> MIV(10U/μl)	0,5
Total do Mix	15,0
Produto da PCR	5,0
Volume final	20,0

A Amplificação por PCR gerou um fragmento de 107 pb. O alelo 1 ou T (Val - G $\overline{I}$ T), selvagem, por não ter sítio de restrição para a enzima *Ngo* MIV, gerou um fragmento de 107 pb. A substituição T→C (alelo 2 ou C ou Ala – G $\overline{C}$ T, mutante) criou um sítio de restrição, gerando dois fragmentos, um de 89 pb e outro de 18 pb (Figura 2) (Mitrinen *et al.*, 2001; Akyol *et al.*, 2005).

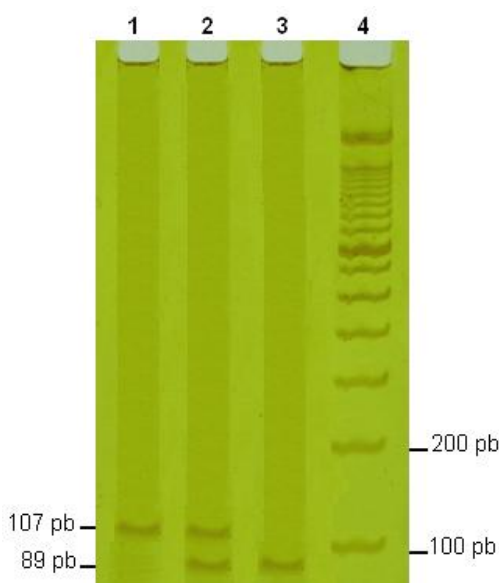


Figura 2 – Análise dos genótipos do polimorfismo *Ngo* MIV no gene da Mn-SOD.

Os produtos da PCR foram digeridos com *Ngo* MIV e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, seguida por coloração com nitrato de prata. **1-** Homozigoto 1-1 (Val/Val); **2-** Heterozigoto 1-2 (Val/Ala); **3-** Homozigoto 2-2 (Ala/Ala); **4-** Padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder). Os tamanhos dos produtos da restrição são indicados nas laterais.

4.3.8.2. Genotipagem da CAT – Polimorfismo –21A/T na região promotora (NCBI, refSNP ID: rs7943316)

As condições de PCR envolveram uma desnaturação inicial do DNA a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão) e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto amplificado de 250 pb foi digerido com a endonuclease *Hinf* I a 37°C durante 4 horas (Tabela 7) e os fragmentos de restrição foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante, a 150 V, 20-30 mA, durante 2 horas e coloração com nitrato de prata.

Tabela 7 – Concentrações e quantidade de reagentes empregados na digestão dos produtos da PCR de CAT com *Hinf* I.

Reagente	Quantidade por tubo (μL)
Água milli-Q	13,4
Tampão 10X	1,2
<i>Hinf</i> I (10U/μl)	0,5
Total do Mix	15,0
Produto da PCR	5,0
Volume final	20,0

A amplificação por PCR gerou um fragmento de 250 pb. O alelo selvagem (A), por apresentar um sítio de restrição para a enzima *Hinf* I, resultou em dois fragmentos, um de 177 pb e outro de 73 pb. A substituição A→T, ao eliminar o sítio de restrição, gerou um fragmento de 250 pb (Figura 3) (Góth e Vitai, 1997; Ukkola *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002).

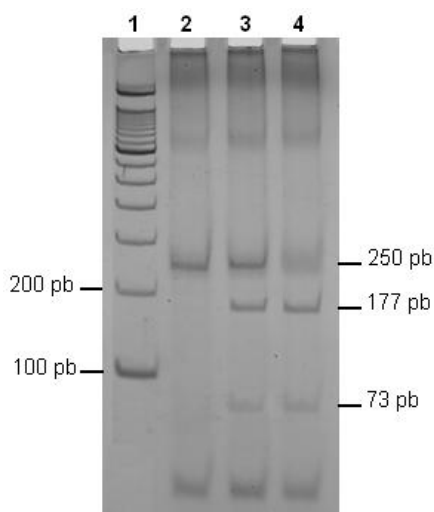


Figura 3 – Análise dos genótipos do polimorfismo *Hinf* I no gene da CAT.

Os produtos da PCR foram digeridos com *Hinf* I e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, seguida por coloração com nitrato de prata. **1-** Padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder); **2-** Homozigoto TT; **3-** Heterozigoto AT; **4-** Homozigoto AA;. Os tamanhos dos produtos da restrição são indicados nas laterais.

4.3.8.3. Genotipagem da GPX1 – Polimorfismo Pro198Leu (NCBI, refSNP ID: rs1050450)

As condições de PCR envolveram uma desnaturação inicial do DNA a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos (anelamento), 72°C por 45 segundos (extensão) e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. O produto amplificado de 400 pb foi digerido com a endonuclease *Apa* I a 30°C durante 16 horas (Tabela 8) e os fragmentos de restrição foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida 10% não-desnaturante, a 150 V, 20-30 mA, durante 4 horas e coloração com nitrato de prata.

Tabela 8 – Concentrações e quantidade de reagentes empregados na digestão dos produtos da PCR de GPX1 com *Apa* I.

Reagente	Quantidade por tubo (μL)
Água milli-Q	13,4
Tampão 10X	1,2
<i>Apa</i> I (10U/μl)	0,6
Total do Mix	15,0
Produto da PCR	5,0
Volume final	20,0

A amplificação por PCR gerou um fragmento de 400 pb. Nesta região, têm sido descritos dois sítios de restrição detectáveis pela enzima *Apa* I: o primeiro gera 2 fragmentos, um de 205 pb e outro de 195 pb; o segundo (localizado dentro do fragmento de 205 pb) gera outros 2 fragmentos, um de 117 pb e outro 88 pb (Zhao *et al.*, 2005). O alelo 1 ou C ou Pro (selvagem) por apresentar os dois sítios de restrição, gerou 3 fragmentos, um de 195 pb, um de 117 pb e outro de 88 pb. Como a substituição C→T eliminou um dos sítios de restrição, o alelo 2 ou T ou Leu (variante) gerou 2 fragmentos, um de 205 pb e outro de 195 pb (Figura 4).

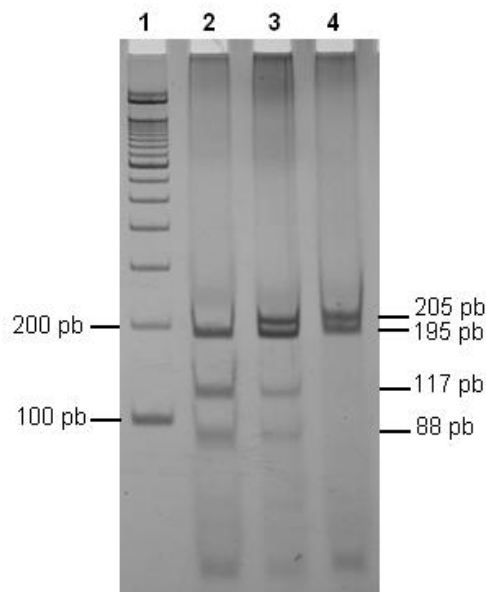


Figura 4 – Análise dos genótipos do polimorfismo *Apa* I no gene da GPX1.

Os produtos da PCR foram digeridos com *Apa* I e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, seguida por coloração com nitrato de prata. **1-** Padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder); **2-** Homozigoto CC ou 1-1 (Pro/Pro); **3-** Heterozigoto CT ou 1-2 (Pro/Leu); **4-** Homozigoto TT ou 2-2 (Leu/Leu). Os tamanhos dos produtos da restrição são indicados nas laterais.

4.3.8.4. Genotipagem da Haptoglobina

Para a visualização dos diferentes alelos da cadeia α da haptoglobina (Hp^{1S} , Hp^{1F} e Hp^2) foram necessárias três PCRs distintas, com pares de iniciadores específicos para cada polimorfismo (Tabelas 9 e 10).

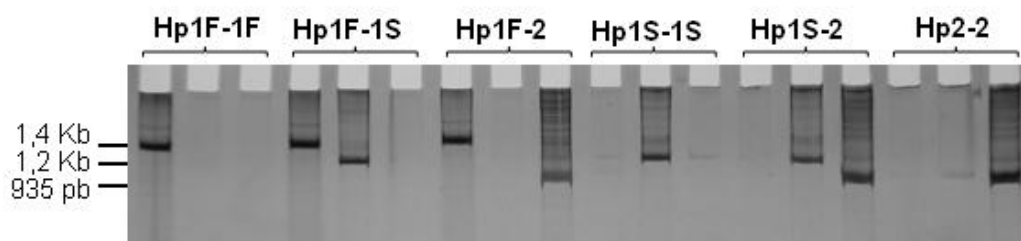
As condições de PCR envolveram uma desnaturação inicial do DNA a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação em três etapas: desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Os fragmentos foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante a 150 V, 20-30 mA, por 1 hora e 30 minutos e corados com nitrato de prata (Figura 5).

Tabela 9 – Sequência de iniciadores utilizados na análise do polimorfismo de Hp.

Haptoglobina	Sequência de nucleotídeos (5'→3')	Referência
F3	CAG GAG TAT ACA CCT TAA ATG	Yano <i>et al.</i> , 1998
S2	TTA TCC ACT GCT TCT CAT TG	
C42	TTA CAC TGG TAG CGA ACC GA	
C72	AAT TTA AAA TTG GCA TTT CGC C	
C51	GCA ATG ATG TCA CGG ATA TC	

Tabela 10 – Pares de iniciadores utilizados na análise do polimorfismo de Hp e seus respectivos tamanhos.

Alelo	Par de iniciador	Tamanho do fragmento
Hp1F	F3 e C72	1,4 Kb
Hp1S	C51 e S2	1,2 Kb
Hp2	F3 e C42	935 pb

**Figura 5** – Análise do polimorfismo da cadeia α da haptoglobina.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, seguida por coloração com nitrato de prata. Cada genótipo está representado por três poços. Os tamanhos dos produtos das PCRs são indicados na lateral direita.

4.3.9. Dosagens séricas de TGO, TGP e CPK

Foram realizadas pelo Laboratório Sabin em um mesmo analisador automatizado, ADVIA 1650 (Bayer Diagnostics), usando-se os reagentes apropriados ADVIA e seguindo-se os protocolos do fabricante.

4.3.10. Hemograma

Os exames foram realizados pelo Laboratório Sabin, em um mesmo aparelho automatizado, Cell-Dyn 3700, seguindo-se o procedimento do fabricante (Abbott) e usando-se controles interno (do fabricante – Cell-Dyn 22) e externo (PELM – Programa de Excelência para Laboratórios Médicos, Control-Lab).

4.3.11. Lipidograma

As dosagens séricas de colesterol total, triglicerídeos, LDL, HDL e VLDL foram realizadas pelo Laboratório Sabin, usando-se método colorimétrico enzimático executado em analisador automatizado Advia 1650 (Bayer Diagnostics).

4.3.12. Dosagem sérica de PCR-US

A PCR-US foi dosada pelo Laboratório Sabin, através de ensaio imunométrico (Immulite 2000).

4.3.13. Análises Estatísticas

Os marcadores utilizados foram submetidos ao teste de probabilidade de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) pelo método convencional do qui-quadrado (χ^2). Os p-valores foram estimados pelo Método de Cadeia de Markov, utilizando-se o programa Genepopweb versão 4.0 (<http://genepop.curtin.edu.au>). O mesmo programa foi usado para calcular as frequências alélicas e genotípicas de cada loco e os parâmetros de diversidade genética tais como heterozigosidade observada (H_i), heterozigosidade esperada (H_s) e coeficiente de endogamia intrapopulacional (F_{IS}).

Para verificar diferenças nos valores dos exames antes e depois das cápsulas de pequi foi usado o teste T para amostras dependentes. A influência de variáveis tais como sexo, faixa etária, Km percorrido e genótipos foi investigada através do seguinte modelo de ANOVA: $Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \rho_j + (\tau\rho)_{ij} + e_{ijk}$, onde μ é a média geral, τ_i o efeito da cápsula do pequi, ρ_j o efeito da j-ésima variável testada e e_{ijk} o erro aleatório. Considerou-se para essas análises apenas os casos em que o erro aleatório e_{ijk} apresentou distribuição normal com média zero e variância constante. Também foram considerados apenas os casos em que os erros associados às observações foram não correlacionados. Uma vez confirmada a não-interação entre o tratamento com as cápsulas de pequi e as variáveis estudadas (sexo, faixa etária, Km percorrido e genótipos), prosseguiu-se com as análises de cada variável separadamente. Neste caso, quando os efeitos das variáveis foram

diferentes de zero, utilizou-se o teste LSD de Fisher para verificar diferenças entre as categorias das variáveis estudadas. Nos casos em que o teste LSD de Fisher detectou diferenças, trabalhou-se com o teste T para amostras dependentes para verificar diferenças nas comparações antes-depois do tratamento com pequi dentro de cada uma das categorias de variáveis. Quando a interação entre a utilização das cápsulas de pequi e a variável estudada não foi rejeitada, as limitações das técnicas de análise de variância impossibilitaram prosseguir separadamente com as análises. As análises foram feitas utilizando-se os softwares aplicativos SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 17.0 e SAS (*Statistical Analysis System*) versão 9.1.3, service pack 3.

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção dos extratos

5.1.1. Verificação do melhor sistema para extração

Uma vez que em testes prévios com os extratos aquoso (EAP) e clorofórmico (ECP) o rendimento-massa foi menor na extração em aparelho soxhlet do que por maceração a frio (dados não mostrados), optou-se pelo segundo tipo de extração, visando não só um maior rendimento mas também evitar a perda de componentes termossensíveis. Posteriormente o método de extração por infusão também foi testado para a obtenção do extrato aquoso. Visto que este método forneceu maior rendimento-massa e houve menos problema de contaminação, foi escolhido para o teste de verificação do rendimento-massa do EAP.

5.1.2. Verificação do rendimento-massa

Os resultados da extração da polpa com diferentes solventes e o rendimento-massa de cada extrato são mostrados na Tabela 11. Nesta etapa, o extrato aquoso (EAP) foi obtido por infusão, enquanto os outros extratos, por maceração a frio. Durante a remoção dos solventes, EAP produziu muita espuma (persistente), indicando a presença de saponinas. EEP e EHEP espumaram muito menos, enquanto ECP e EHP não produziram espuma.

Tabela 11 - Resultados do rendimento-massa obtidos após extração da polpa do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) com diferentes solventes.

Solvente	Extrato	Rendimento-massa (g/100g polpa)
Hexano	Extrato hexânico (EHP)	2.8
Clorofórmio	Extrato clorofórmico (ECP)	3.9
Água destilada	Extrato aquoso (EAP)	3.4
Etanol	Extrato etanólico (EEP)	3.0
Água destilada/etanol (1:1)	Extrato hidro-etanólico (EHEP)	2.2

Embora o rendimento-massa de EAP e de ECP tenham sido similares, a remoção da água do EAP foi extremamente demorada, uma vez que nesta etapa os solventes foram removidos à temperatura ambiente. Enquanto somente algumas horas foram requeridas para remover o clorofórmio do ECP, foram necessários três dias para que a água fosse completamente retirada do EAP. Neste caso, o EAP foi congelado entre os procedimentos de remoção do solvente para evitar a contaminação.

5.2. Testes pré-clínicos e toxicológicos em camundongos

5.2.1. Teste do micronúcleo (MN)

A média e o desvio-padrão (DP) dos resultados obtidos na pesquisa de micronúcleos em células da medula óssea de camundongos são apresentados na Tabela 12. Como previamente publicado (Miranda-Vilela *et al.*, 2008), nenhuma das concentrações usadas de EOP (1 mL kg^{-1} ou $0,5 \text{ mL kg}^{-1}$, grupos M3 e M8, respectivamente) teve efeito clastogênico ou citotóxico sobre as células da medula óssea de camundongos quando comparadas com o grupo controle (M1). Entretanto, o índice de proliferação celular, expresso como porcentagem de EPC (%EPC), aumentou nos grupos M3 e M8 ($p=0,0117$ e $p=0,0460$, respectivamente). Não houve diferença significativa nas frequências de MN-EPC ($p=0,5780$), de MN-ENC ($p=0,7004$) e do índice de proliferação celular ($p=0,9163$) entre os grupos M3 e M8. O grupo tratado com CP a 30 mg kg^{-1} (M2) apresentou aumento significativo na frequência de MN-EPC ($p=0,0006$) quando comparado ao grupo controle (M1), porém não houve redução significativa na %EPC ($p=0,5286$). O tratamento conjugado de CP a 30 mg kg^{-1} com EOP a $0,5 \text{ mL kg}^{-1}$ (grupo M9) não afetou significativamente a porcentagem de EPC quando comparado ao grupo M2. No entanto, o aumento da frequência de MN-EPC durante o tratamento conjugado de CP a 30 mg kg^{-1} com EOP a 1 mL kg^{-1} (grupo M4) foi maior do que a soma das frequências individuais apresentadas por CP e EOP ($p = 0,0309$). BLM a 50 mg kg^{-1} (grupo M5) provocou lise das células da medula óssea, como mostrado na Figura 6. Na concentração de 25 mg kg^{-1} , a BLM não alterou significativamente a frequência de MN-EPC (grupo M7 contra grupo M1), mas na concentração de 10 mg kg^{-1} (grupo M11) houve indução significativa de MN-EPC.

Tabela 12 – Avaliação de micronúcleos (MN) nas células da medula óssea de camundongos da linhagem Swiss albino tratados por via oral (v.o.) com extrato orgânico (EOP) da polpa do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), exclusivamente ou conjugado com uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de Bleomicina (BLM) ou de Ciclofosfamida (CP).

Grupo	Tratamento	Eritrócitos policromáticos (EPC)		Eritrócitos normocromáticos (ENC)
		Índice de proliferação celular (%EPC)	Média e DP do número de MN	Média e DP do número de MN
M1	Controle (água filtrada)	59,22 ± 3,34	1,38 ± 1,06	0,75 ± 0,88
M2	CP (30 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h antes do sacrifício)	58,23 ± 6,81	11,5 ± 6,71 ^g	0,5 ± 0,92
M3	EOP (1 mL kg ⁻¹ , v.o., durante 10 dias)	67,26 ± 6,33 ^a	1 ± 0,75	0,5 ± 1,06
M4	EOP (1 mL kg ⁻¹ , v.o., durante 10 dias) + CP (30 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h antes do sacrifício)	63,00 ± 10,10	22,63 ± 13,23 ^{h,i}	1,25 ± 1,48
M5	BLM (50 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h antes do sacrifício)	0*	0*	0*
M6	EOP (1 mL kg ⁻¹ , v.o., durante 10 dias) + BLM (50 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h antes do sacrifício)	53,65 ± 8,38 ^b	5,37 ± 2,82 ^{j,k}	2,00 ± 1,41
M7	BLM 25 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h antes do sacrifício)	49,99 ± 11,88	2,25 ± 1,38	1,75 ± 1,03
M8	EOP (0,5 mL kg ⁻¹ , v.o., durante 10 dias)	67,62 ± 9,66 ^c	1,00 ± 1,41	0,5 ± 0,75
M9	EOP (0,5 mL kg ⁻¹ , v.o., durante 10 dias) + CP (30 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h antes do sacrifício)	57,84 ± 7,31	9,25 ± 4,71	1,87 ± 1,95
M10	EOP (0,5 mL kg ⁻¹ , v.o., durante 10 dias) + BLM 25 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h antes do sacrifício)	51,01 ± 6,56 ^d	2,75 ± 0,88 ^l	0,63 ± 0,74 ^o
M11	BLM (10 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h antes do sacrifício)	59,07 ± 2,28	8,25 ± 3,24 ^m	1,37 ± 1,18
M12	EOP (0,5 mL kg ⁻¹ , v.o., durante 10 dias) + BLM (10 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h antes do sacrifício)	65,37 ± 6,77 ^{e,f}	5,37 ± 1,50 ⁿ	1,62 ± 1,59

*Foi observado grande lisado celular na medula óssea, com poucas células e ausência de eritrócitos em todos os animais tratados, como mostrado na Figura 6.

^ap=0,0117 comparado com M1. ^bp=0,0003 comparado com M5. ^cp=0,0460 comparado com M1. ^dp=0,01003 comparado com M1. ^ep=0,0357 comparado com M11. ^fp=0,0357 comparado com M1. ^gp=0,0006 comparado com M1. ^hp=0,0309 comparado com M2. ⁱp=0,0006 comparado com M1. ^jp=0,0003 comparado com M5. ^kp=0,0009 comparado com M1. ^lp=0,0172 comparado com M1. ^mp=0,0006 comparado com M1. ⁿp=0,0009 comparado com M1. ^op=0,0332 comparado com M7.

A comparação dos grupos M5 e M6 mostrou que o EOP a 1 mL kg⁻¹ protegeu claramente as células da medula óssea contra a lise induzida pela BLM a 50 mg kg⁻¹ (p=0,0003 para MN-EPC, p=0,0011 para MN-ENC e p=0,0003 para %EPC). Por outro lado, o tratamento conjugado de EOP a 0,5 mL kg⁻¹ + BLM a 25 mg kg⁻¹ (grupo M10) não afetou significativamente a frequência de

MN-EPC, mas reduziu a frequência de MN-ENC quando comparado ao grupo M7 ($p=0,0332$). Apesar da redução de MN-EPC não ter sido significativa quando comparados os grupos M11 (BLM a 10 mg kg^{-1}) e M12 (EOP a $0,5 \text{ mL kg}^{-1}$ + BLM a 10 mg kg^{-1}), a %EPC aumentou significativamente após o tratamento conjugado ($p=0,0357$).

5.2.2. Teste do Cometa

Como previamente publicado (Miranda-Vilela *et al.*, 2008 – Anexo III), a Tabela 13 mostra a média e o desvio-padrão (DP) do índice de danos no DNA (ID) obtidos no teste do cometa realizado em leucócitos do sangue periférico de camundongos tratados com EOP ($0,5 \text{ mL kg}^{-1}$; grupo C3) e EAP (1 mL kg^{-1} ; grupo C7). Os tratamentos com EOP (C3) e EAP (C7) não afetaram significativamente o índice de danos no DNA (ID), se comparados com o grupo C1 (controle negativo), indicando que os extratos não tiveram efeito genotóxico sobre as células.

Tabela 13 – Teste do cometa em leucócitos do sangue periférico de camundongos da linhagem Swiss albino tratados por via oral (v.o.) com extrato orgânico (EOP) ou extrato aquoso (EAP) da polpa do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), exclusivamente ou conjugados com injeção intraperitoneal (i.p.) de Bleomicina (BLM) ou Ciclofosfamida (CP).

Grupos	Tratamentos	Média e DP do ID
C1	Controle (água filtrada)	$121,00 \pm 20,89$
C2	CP (30 mg kg^{-1} , i.p., 48 e 24 h antes do sacrifício)	$313,50 \pm 26,91^a$
C3	EOP ($0,5 \text{ mL kg}^{-1}$, v.o., durante 10 dias)	$171,13 \pm 68,18$
C4	EOP ($0,5 \text{ mL kg}^{-1}$, v.o., durante 10 dias) + CP (30 mg kg^{-1} , i.p., 48 e 24 h antes do sacrifício)	$144,75 \pm 57,22^b$
C5	BLM (25 mg kg^{-1} , i.p., 24 h antes do sacrifício)	$180,25 \pm 39,96^c$
C6	EOP ($0,5 \text{ mL kg}^{-1}$, v.o., durante 10 dias) + BLM (25 mg kg^{-1} , i.p., 24 h antes do sacrifício)	$157,75 \pm 27,03^d$
C7	EAP (1 mL kg^{-1} , v.o., durante 10 dias)	$169,25 \pm 33,13$
C8	EAP (1 mL kg^{-1} , v.o., durante 10 dias) + CP (30 mg kg^{-1} , i.p., 48 e 24 h antes do sacrifício)	$139,13 \pm 16,57^e$
C9	EAP (1 mL kg^{-1} , v.o., durante 10 dias) + BLM (25 mg kg^{-1} , i.p., 24 h antes do sacrifício)	$131,13 \pm 14,29^{f,g}$

^a $p=0,0008$ comparado com C1. ^b $p=0,0008$ comparado com C2. ^c $p=0,0016$ comparado com C1. ^d $p=0,0134$ comparado com C1. ^e $p=0,0008$ comparado com C2. ^f $p=0,0273$ comparado com C6. ^g $p=0,0023$ comparado com C5.

CP a 30 mg kg^{-1} (grupo C2) e BLM a 25 mg kg^{-1} (grupo C5) foram significativamente genotóxicas quando comparadas com o grupo C1 ($p=0,0008$ e $p=0,0016$, respectivamente). Por outro lado, não houve diferença significativa nas comparações do grupo controle (C1) com os

grupos C4 e C8, indicando que nas concentrações testadas ambos os extratos foram eficientes em proteger as células contra a genotoxicidade de CP a 30 mg kg⁻¹. A comparação do grupo C2 com os grupos C4 e C8 corroborou com este efeito protetor ($p=0,0008$ em ambos os casos). Quando o grupo C5 foi comparado com os grupos C6 e C9, somente o EAP mostrou proteção significativa ($p=0,0023$), indicando que o EAP a 1 mL kg⁻¹ forneceu a maior proteção do que EOP a 0,5 mL kg⁻¹ contra o efeito genotóxico da BLM a 25 mg kg⁻¹.

5.2.3. Teste de TBARS

A média e o desvio-padrão (DP) dos resultados da fluorescência, bem como a concentração média de malonaldeído (MDA) em nmol/mL verificada a partir da comparação da curva-padrão com a fluorescência obtida no teste de TBARS com camundongos são mostrados na Tabela 14, como previamente publicado (Miranda-Vilela *et al.*, 2008).

Tabela 14 – Peroxidação lipídica no plasma (níveis de TBARS) de camundongos da linhagem Swiss albino tratados por via oral (v.o.) com extrato orgânico (EOP) ou extrato aquoso (EAP) da polpa do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.).

Grupos	Tratamentos	Média e DP da fluorescência	MDA (nmol/mL) (média $\pm$ DP)
T1	Controle fêmea (água filtrada)	311,16 $\pm$ 41,26	0,023 $\pm$ 0,003
T2	Controle macho (água filtrada)	307,90 $\pm$ 18,17	0,023 $\pm$ 0,001
T3	Fêmeas tratadas com EOP (0,5 mL kg ⁻¹ , v.o., durante 10 dias)	337,31 $\pm$ 39,59	0,025 $\pm$ 0,003
T4	Machos tratados com EOP (0,5 mL kg ⁻¹ , v.o., durante 10 dias)	421,36 $\pm$ 46,29 ^a	0,031 $\pm$ 0,003 ^a
T5	Fêmeas tratadas com EAP (1 mL kg ⁻¹ , v.o., durante 10 dias)	345,00 $\pm$ 28,42 ^b	0,026 $\pm$ 0,002 ^b
T6	Machos tratados com EAP (1 mL kg ⁻¹ , v.o., durante 10 dias)	392,20 $\pm$ 39,95 ^c	0,029 $\pm$ 0,003 ^c

^a $p=0,00002$ comparado com T2. ^b $p=0,0248$ comparado com T1. ^c $p=0,0001$ comparado com T2.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os sexos, quando comparados os grupos controle fêmea (T1) e controle macho (T2). Não houve igualmente diferença significativa entre os grupos T1 e T3, T3 e T5 ou T4 e T6. Entretanto, camundongos tratados com EAP apresentaram aumento significativo da peroxidação lipídica ($p=0,0248$ para T1 contra T5, e $p=0,0001$ para T2 contra T6), especialmente os machos. Resultado semelhante foi observado entre os machos do grupo controle e os machos tratados com o EOP (T2 contra T4, $p=0,00002$).

5.3. Testes com voluntários atletas

5.3.1. Análise dos marcadores genéticos

A distribuição das frequências alélicas dos locos de Hp, Mn-SOD, CAT e GPX1 e os parâmetros de diversidade genética são apresentados na Tabela 15, enquanto a distribuição das frequências genótípicas e os dados para o teste χ^2 (EHW) são mostrados na Tabela 16. O teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) indicou a existência de desvios significativos nos locos de Hp ($p=0,0074$) e Mn-SOD ($p=0,0000$), condizentes com uma deficiência de heterozigotos para o loco da Hp ($p=0,9990$ para H_0 = excesso de heterozigotos; $p=0,0009$ para H_0 = deficiência de heterozigotos) e um excesso de heterozigotos para o loco da Mn-SOD ($p=0,0000$ para H_0 = excesso de heterozigotos; $p=1$ para H_0 = deficiência de heterozigotos). Comparando os valores de heterozigosidade observada (H_i) e esperada (H_s) do loco Hp (Tabela 15), podemos notar que os principais fatores que contribuíram para o desvio do EHW foram a maior frequência observada de Hp1F-1F e de Hp1S-1S em relação à esperada e a menor frequência observada de Hp1F-1S em relação à esperada (Tabela 16). Quando os alelos Hp^{*1} foram tratados como um bloco único, a distribuição das frequências dos genótipos Hp apresentou-se de acordo com o EHW ($p=0,2181$), sendo rejeitadas as hipóteses de excesso ou deficiência de heterozigotos ($p>0,05$). A distribuição das frequências nos locos de CAT e GPX1 apresentou-se de acordo com o EHW, sendo rejeitadas as hipóteses de excesso ou deficiência de heterozigotos para esses locos ($p>0,05$). Os valores do coeficiente de endogamia intrapopulacional (F_{IS}) indicaram a existência de níveis relativamente reduzidos de endogamia ou de excesso de homozigotos para esses locos (Tabela 15). Por outro lado, o loco da Mn-SOD apresentou valores de H_i mais altos do que os valores de H_s , sendo o valor de F_{IS} compatível com seleção a favor dos heterozigotos ou exogamia ($F_{IS}=-0,6302$) (Tabela 15). Porém, quando a população foi testada como um todo (teste multi-locos), os valores de p obtidos pelo Método de Cadeia de Markov foram condizentes com a rejeição da hipótese H_0 de excesso de heterozigotos ($p=0,6578$) ou de deficiência de heterozigotos ($p=0,3271$).

Tabela 15 – Distribuição das frequências alélicas dos locos de haptoglobina, MN-SOD, CAT e GPX1 e parâmetros de diversidade genética.

Marcadores	Haptoglobina			Mn-SOD		CAT		GPX1		
	Alelos Hp ^{*1}			Alelo Hp ^{*2}	Alelo 1 (Val)	Alelo 2 (Ala)	Alelo A	Alelo T	Alelo 1 (Pro)	Alelo 2 (Leu)
	Hp ^{*1F}	Hp ^{*1S}	Total							
Frequências alélicas	0,176	0,332	0,508	0,492	0,568	0,432	0,396	0,604	0,688	0,312
Heterozigosidade observada (H _i)	0,504*				0,800**		0,424		0,400	
Heterozigosidade esperada (H _s)	0,6167*				0,4908**		0,4784		0,4293	
Coefficiente de endogamia intrapopulacional (F _{IS})	+0,1828				−0,6302		+0,1137		+0,0683	

*, **Valores de $p < 0,05$ indicam, respectivamente, deficiência ($p = 0,0009$) e excesso ($p = 0,0000$) de heterozigotos e foram gerados pelo programa de estatística Genepopweb versão 4.0.

Tabela 16 – Distribuição das frequências genotípicas dos locos de haptoglobina, MN-SOD, CAT e GPX1 e dados para o teste de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) pelo método convencional do chi-quadrado (χ^2).

Marcadores	Haptoglobina*						Mn-SOD*			CAT			GPX1		
Genótipos	1F-1F	1F-1S	1S-1S	1F-2	1S-2	2-2	1-1	1-2	2-2	AA	AT	TT	1-1	1-2	2-2
Frequências genotípicas	0,064	0,064	0,160	0,160	0,280	0,272	0,168	0,800	0,032	0,184	0,424	0,392	0,488	0,400	0,112
Nº de indivíduos observado	8	8	20	20	35	34	21	100	04	23	53	49	61	50	14
Nº de indivíduos esperado	3,87	14,61	13,78	21,65	40,84	30,26	40,33	61,34	23,33	19,60	59,80	45,60	59,17	53,66	12,17

*Valores de $p < 0,05$ indicam desvio no Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p = 0,0074$ para Hp e $p = 0,0000$ para Mn-SOD) e foram gerados pelo programa de estatística Genepopweb versão 4.0.

5.3.2. Avaliação dos efeitos do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) contra danos oxidativos induzidos pelo exercício

Todos os resultados dos exames realizados pelo Laboratório Sabin foram comparados com os valores de referência fornecidos pelo laboratório (Anexo VII).

A distribuição dos atletas por faixa etária no grupo total e por sexo é mostrada na Tabela 17.

Tabela 17 – Distribuição dos atletas por faixa etária (em anos) no grupo total e por sexo.

Faixa etária	Total	Homens	Mulheres
15–19	20	13	07
20–24	25	16	09
25–29	25	16	09
30–34	12	09	03
35–39	16	09	07
40–44	10	05	05
≥45 anos	17	08	09

A distribuição dos atletas por distância percorrida pelo grupo total e por sexo é mostrada na Tabela 18.

Tabela 18 – Distribuição dos atletas por distância percorrida (em Km) pelo grupo total e por sexo.

Distância percorrida	Total	Homens	Mulheres
4–5	50	28	22
6–7	38	22	16
8–10	30	20	10
16–21	07	06	01

5.3.2.1. Dosagens séricas de TGO, TGP e CPK e teste do Cometa

As influências da suplementação com óleo de pequi nas dosagens séricas de TGO, TGP e CPK e no índice de danos no DNA (ID – teste do cometa) do grupo total são mostradas nas Figuras 6 e 7. Após ingestão do óleo do pequi houve uma tendência geral de redução de danos nos tecidos e no DNA, tanto para o grupo total quanto para os sexos masculino e feminino, exceto para o teste do cometa após tratamento com peróxido de hidrogênio a 250 μ M e para o grupo de mulheres no teste de CPK. No grupo total, os resultados do teste T para amostras dependentes foram significativos para o TGO ($p=0,0202$), TGP ($p=0,0292$) e cometa ($p=0,0003$ para o controle e $p=0,0467$ para o tratamento com H₂O₂ a 1mM).

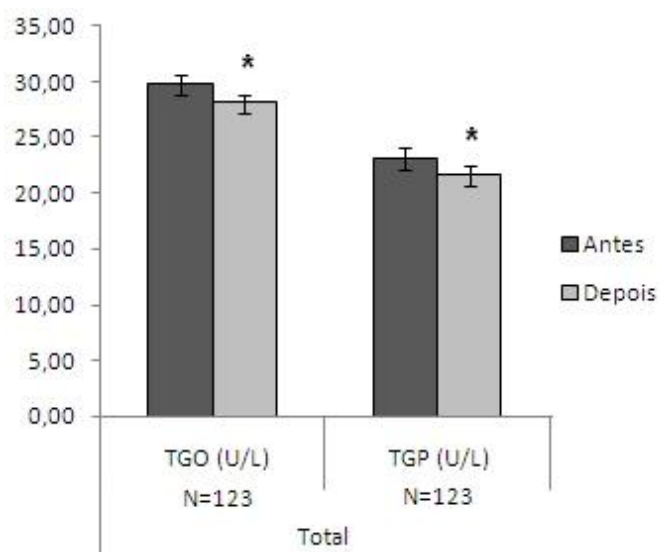


Figura 6 – Influências da suplementação com óleo de pequi nas dosagens séricas de TGO e TGP do grupo total.

Os dados correspondem às médias e ao erro padrão da média (EP). Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,05$) e altamente significativas (** $p < 0,01$) na comparação antes-depois dos valores pelo Teste T para amostras dependentes.

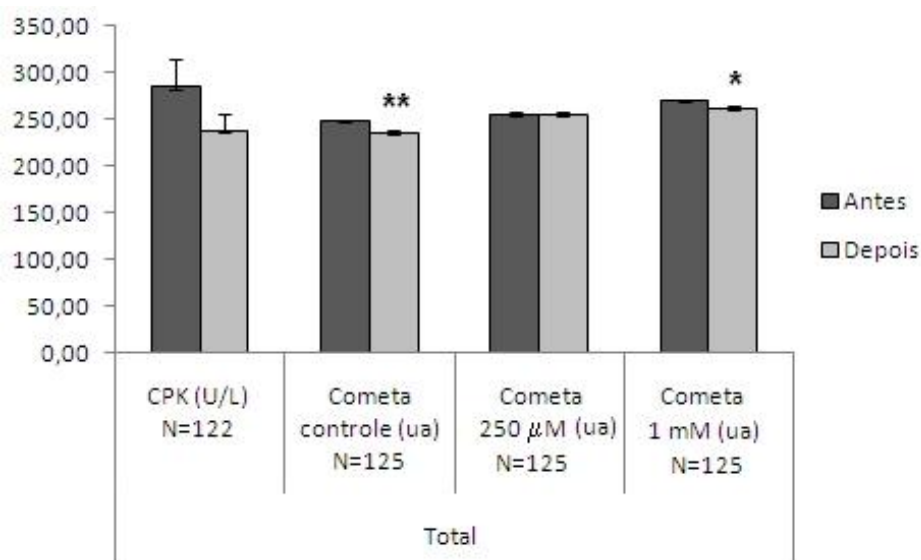


Figura 7 – Influências da suplementação com óleo de pequi nas dosagens séricas de CPK e no índice de danos no DNA (ID – teste do cometa) do grupo total.

Os dados correspondem às médias e ao erro padrão da média (EP). Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,05$) e altamente significativas (** $p < 0,01$) na comparação antes-depois dos valores pelo Teste T para amostras dependentes.

As influências da suplementação com óleo de pequi nas dosagens séricas de TGO, TGP e CPK e no índice de danos no DNA (ID – teste do cometa) dos sexos masculino e feminino são mostradas nas tabelas 19 e 20.

Tabela 19 – Influências da suplementação com óleo de pequi nas dosagens séricas de TGO, TGP e CPK dos sexos masculino e feminino.

Sexo	TGO		TGP		CPK	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Masculino	31,14 ± 0,95	30,38 ± 0,82	23,77 ± 1,23	23,18 ± 1,18	373,56 ± 47,37	293,82 ± 30,48
Feminino	27,84 ± 1,32	24,92 ± 0,89*	22,04 ± 1,78	19,24 ± 0,90*	149,92 ± 16,99	150,76 ± 18,07

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média). Os asteriscos indicam diferenças significativas (*p<0,05) na comparação antes-depois dos valores pelo Teste T para amostras dependentes, sendo p=0,0186 para TGO e p=0,0334 para TGP.

Tabela 20 – Influências da suplementação com óleo de pequi no índice de danos no DNA (ID – teste do cometa) dos sexos masculino e feminino.

Sexo	ID controle		ID 250µm		ID 1mM	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Masculino	241,38 ± 3,09	231,99 ± 4,01*	249,68 ± 4,31	249,43 ± 4,09	266,76 ± 3,25	258,92 ± 4,77
Feminino	256,59 ± 4,27	239,12 ± 3,50**	262,55 ± 5,45	264,20 ± 5,01	272,86 ± 4,34	263,27 ± 5,18

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média). Os asteriscos indicam diferenças significativas (*p=0,0382) e altamente significativas (**p=0,0010) na comparação antes-depois dos valores pelo Teste T para amostras dependentes.

O modelo de análise de variância usado para verificar a influência da variável sexo mostrou que não houve interação entre os fatores tratamento com as cápsulas de pequi e categorias da variável em questão (homens e mulheres) para os testes utilizados (TGO, TGP, CPK, ID controle, ID 250µM e ID 1mM de H₂O₂). Sendo assim, prosseguiu-se separadamente com as análises.

Os resultados mostraram fortes evidências de que o fator sexo exerceu efeito na resposta das variáveis TGO e TGP, que apresentaram diferenças altamente significativa entre as médias (p<0,0001 para TGO e TGP). Nas comparações antes-depois o teste T para amostras dependentes mostrou diferenças significativas nos valores de TGO e TGP apenas para o sexo feminino (p=0,0186 para TGO e p=0,0334 para TGP). Para CPK, os resultados indicaram que apenas o fator sexo influenciou (p<0,0001). Para o teste do cometa, ambos os fatores considerados no modelo (tratamento com as cápsulas de pequi e sexo) tiveram efeito na resposta da variável ID controle. Nos dois casos verificou-se diferença significativa entre as médias (p=0,0006 para tratamento com as cápsulas de pequi e p=0,0041 para os sexos). O teste T para amostras dependentes indicou que a redução no ID controle observada após tratamento com

pequi foi altamente significativa para mulheres ($p=0,0010$) e significativa para homens ($p=0,0382$). Já no tratamento com H_2O_2 , somente o fator sexo influenciou na resposta da variável ID $250\mu M$ ($p=0,0039$), porém o fator sexo não influenciou na resposta da variável ID $1mM$ e o tratamento com as cápsulas de pequi obteve um p-valor um pouco acima do nível de significância comumente utilizado ($p=0,0539$). Em ambos os tratamentos com H_2O , não foram mostradas diferenças significativas nas comparações antes-depois pelo teste T para amostras dependentes para nenhum dos sexos.

A influência da suplementação com óleo de pequi nas diferentes faixas etárias (Tabelas 21 e 22) mostrou igualmente uma tendência geral de redução da média e do erro padrão da média (EP) nos valores dos testes para quase todos os grupos etários. A análise de variância mostrou que não houve interação entre os fatores tratamento e idade para os testes de TGO, TGP, CPK, ID controle e ID $1mM$ de H_2O_2 . Portanto, para esses testes foi possível prosseguir separadamente com as análises. Já para o tratamento com peróxido a $250\mu M$ (ID $250\mu M$) a interação entre os fatores tratamento e idade não foi rejeitada ($p=0,0263$). Sendo assim, as limitações das técnicas de análise de variância impossibilitaram analisar separadamente o efeito de cada uma das faixas etárias sobre a variável em questão.

Tabela 21 – Influência da suplementação com óleo de pequi nos testes de TGO, TGP e CPK por faixa etária.

Faixa Etária	TGO (U/L)		TGP (U/L)		CPK (U/L)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
15–19	32,55 ± 2,16	27,60 ± 1,59*	21,7 ± 1,43	21,25 ± 2,06	433,85 ± 138,84	327,75 ± 59,00
20–24	29,04 ± 2,19	26,4 ± 1,28	22,36 ± 3,19	18,88 ± 1,49	269,72 ± 56,16	249,04 ± 72,08
25–29	27,96 ± 1,28	28,46 ± 1,46	20,08 ± 1,45	20,21 ± 1,65	337,57 ± 72,03	248,09 ± 31,56
30–34	28,75 ± 2,21	27,83 ± 3,00	21,08 ± 3,36	19,08 ± 2,63	231,33 ± 43,36	156,83 ± 15,19
35–39	31,63 ± 2,25	29,75 ± 1,36	26,69 ± 3,31	25,00 ± 2,93	234,69 ± 48,43	226,25 ± 42,91
40–44	26,89 ± 1,45	27,89 ± 1,67	22,22 ± 2,34	23,67 ± 2,94	198,44 ± 58,05	166,11 ± 35,07
≥45 anos	31,00 ± 2,23	30,18 ± 2,16	28,47 ± 2,85	25,53 ± 1,97	183,24 ± 27,89	197,18 ± 39,56

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média). U/L = unidades por litro. O asterisco indica diferença significativa ($*p=0,0134$) na comparação antes-depois dos valores pelo Teste T para amostras dependentes.

Em relação à TGO a análise de variância mostrou que nem o tratamento com pequi nem a faixa etária influenciaram, pelos altos p-valores observados; entretanto, o teste T indicou redução significativa nos valores de TGO para a faixa etária de 15–19 anos ($p=0,0134$) após tratamento

com pequi. Já para TGP, apenas a idade exerceu influência ($p=0,0148$). Para detectar diferenças entre faixas etárias específicas utilizou-se o teste LSD de Fisher, cujos resultados (p-valores) são apresentados na Tabela 23. Os p-valores significativos ($p<0,05$) e altamente significativos ($p<0,01$) foram destacados em vermelho.

Tabela 22 – Influência da suplementação com óleo de pequi no índice de danos no DNA (ID – teste do cometa) por faixa etária.

Faixa Etária	ID controle (ua)		ID H ₂ O ₂ 250µM (ua)		ID H ₂ O ₂ 1mM (ua)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
15–19	249,75 ± 5,49	249,15 ± 4,41	251,50 ± 7,61	266,05 ± 5,51	269,60 ± 5,86	278,05 ± 4,86
20–24	245,52 ± 5,51	221,2 ± 5,66**	244,44 ± 6,61	254,80 ± 7,77	266,04 ± 6,06	257,12 ± 7,54
25–29	245,28 ± 6,74	231,52 ± 2,87	235,52 ± 7,59	252,44 ± 8,11	261,60 ± 6,92	247,92 ± 7,88
30–34	228,83 ± 5,32	211,33 ± 16,63	264,67 ± 12,75	225,33 ± 10,22	264,58 ± 8,47	237,42 ± 13,44
35–39	256,13 ± 7,67	248,50 ± 6,28	266,25 ± 9,97	253,13 ± 8,79	280,88 ± 6,07	268,06 ± 12,76
40–44	240,90 ± 8,70	237,00 ± 12,70	271,10 ± 7,68	262,00 ± 12,99	272,80 ± 5,05	277,20 ± 11,71
≥45 anos	258,82 ± 7,29	245,00 ± 5,87	274,41 ± 9,10	266,29 ± 6,10	274,35 ± 7,77	263,59 ± 7,86

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média). ID = índice de danos no DNA; ua = unidades arbitrárias. Os asteriscos indicam diferenças altamente significativas (* $p=0,0014$) na comparação antes-depois dos valores pelo Teste T para amostras dependentes.

Tabela 23 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de TGP e as diferentes faixas etárias (em anos).

Faixas etárias	15–19	20–24	25–29	30–34	35–39	40–44	≥ 45 anos
15–19		0,6887	0,5372	0,5921	0,0680	0,6068	0,0192
20–24	0,6887		0,8155	0,8299	0,0225	0,4008	0,0047
25–29	0,5372	0,8155		0,9802	0,0136	0,3146	0,0026
30–34	0,5921	0,8299	0,9802		0,0348	0,3620	0,0104
35–39	0,0680	0,0225	0,0136	0,0348		0,3284	0,6408
40–44	0,6068	0,4008	0,3146	0,3620	0,3284		0,1674
≥ 45 anos	0,0192	0,0047	0,0026	0,0104	0,6408	0,1674	

Os p-valores significativos ($p<0,05$) e altamente significativos ($p<0,01$) foram destacados em vermelho.

Para TGP, os resultados indicaram diferenças significativas entre a faixa etária de 35–39 anos e as faixas etárias mais jovens (até 30–34 anos) e entre a faixa etária ≥ 45 anos e as faixas etárias mais jovens (até 30–34 anos), não havendo diferenças entre a faixa etária de 40–44 anos e

as demais. Nenhuma diferença significativa nas comparações antes-depois foi indicada pelo teste T para amostras dependentes.

Para CPK, verificou-se que a faixa etária influenciou apenas se considerados níveis de significância superiores a 5,49%.

Quanto ao índice de danos no DNA (ID – teste do cometa), a análise de variância indicou influência tanto da idade ($p < 0,0001$) quanto do tratamento com pequi ($p = 0,0028$); os resultados indicaram que houve diferença na comparação antes-depois da ingestão das cápsulas de pequi no ID controle ($p = 0,0028$), sendo que esta variável diminuiu após a suplementação. As diferenças entre as faixas etárias detectadas pelo teste LSD de Fisher são mostradas na Tabela 24. Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho. Mesmo com o aumento do estresse oxidativo provocado pelo tratamento com H_2O_2 , as análises indicaram que, após ingestão das cápsulas de pequi, houve redução no ID 1mM de H_2O_2 em níveis de significância superiores a 5,78%.

Tabela 24 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de ID controle e as diferentes faixas etárias (em anos).

Faixas etárias	15–19	20–24	25–29	30–34	35–39	40–44	≥ 45 anos
15–19		0,0091	0,0722	0,0001	0,6761	0,1851	0,7148
20–24	0,0091		0,3833	0,0651	0,0041	0,4647	0,0042
25–29	0,0722	0,3833		0,0112	0,0342	0,9426	0,0362
30–34	0,0001	0,0651	0,0112		<0,0001	0,0318	<0,0001
35–39	0,6761	0,0041	0,0342	<0,0001		0,1055	0,9551
40–44	0,1851	0,4647	0,9426	0,0318	0,1055		0,1122
≥ 45 anos	0,7148	0,0042	0,0362	<0,0001	0,9551	0,1122	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

Apesar dos resultados acima, a única faixa etária que apresentou diferenças significativas nas comparações antes-depois pelo teste T para amostras dependentes foi a de 20–24 anos ($p = 0,0014$).

Como pode ser observado na Tabela 25, o aumento de danos nos tecidos verificado pelas dosagens séricas de TGO e TGP antes da suplementação com pequi foi proporcional à distância percorrida, não ocorrendo o mesmo com CPK. Os resultados da estatística descritiva mostraram que houve uma tendência geral de redução de danos nos tecidos, detectada pelos testes de TGO, TGP e CPK, para todas as distâncias percorridas após suplementação com o óleo de pequi. O teste do cometa (controle) apresentou a mesma tendência geral, exceto para a faixa de 16–21 km,

que apesar de apresentar aumento na média do ID controle, apresentou redução no erro padrão da média (Tabela 26). Este aumento na média do ID controle após suplementação com óleo de pequi foi relacionado à distância de 21 Km. Por outro lado, a maior redução na média do ID controle observada neste estudo foi relacionada à distância de 19 Km.

Tabela 25 – Influência da suplementação com óleo de pequi nos testes de TGO, TGP e CPK por distância percorrida (em Km).

Distância percorrida	TGO (U/L)		TGP (U/L)		CPK (U/L)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
4–5	27,65 ± 1,15	26,86 ± 1,07	20,12 ± 1,18	19,43 ± 1,27	219,46 ± 31,03	205,73 ± 23,82
6–7	29,49 ± 1,40	27,24 ± 1,36*	24,43 ± 1,77	21,95 ± 1,26*	348,14 ± 76,76	242,14 ± 33,66
8–10	32,73 ± 1,74	30,50 ± 0,87	24,77 ± 2,72	23,20 ± 1,89	286,40 ± 59,69	260,37 ± 59,27
16–21	34,29 ± 2,93	32,86 ± 2,03	29,43 ± 5,00	28,29 ± 2,29	372,71 ± 98,86	313,00 ± 84,84

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média). U/L = unidades por litro. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,05$) na comparação antes-depois dos valores pelo Teste T para amostras dependentes, sendo $p = 0,0499$ para TGO e $p = 0,0300$ para TGP.

Tabela 26 – Influência da suplementação com óleo de pequi no índice de danos no DNA (ID – teste do cometa) por distância percorrida (em Km).

Distância percorrida	ID controle (ua)		ID 250 μ M (ua)		ID 1mM (ua)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
4–5	244,00 ± 3,26	234,68 ± 3,87	244,68 ± 4,89	250,32 ± 5,14	267,18 ± 4,07	256,12 ± 6,12
6–7	255,66 ± 5,60	241,76 ± 3,59*	265,63 ± 6,11	269,58 ± 5,75	272,66 ± 5,22	271,08 ± 4,70
8–10	240,60 ± 5,13	219,97 ± 7,61**	249,73 ± 7,56	244,57 ± 5,93	267,77 ± 5,21	250,90 ± 7,92
16–21	255,00 ± 12,28	261,14 ± 8,99	288,71 ± 5,78	258,00 ± 12,31	270,14 ± 7,52	277,71 ± 11,68

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média). ID = índice de danos no DNA; ua = unidades arbitrárias. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p = 0,0404$) e altamente significativas (* $p = 0,0090$) na comparação antes-depois dos valores pelo Teste T para amostras dependentes.

A análise de variância para TGO indicou que não houve interação entre os fatores tratamento e distância percorrida; portanto prosseguiu-se com as análises separadamente para cada variável (Km). Os resultados também indicaram que os diferentes valores obtidos com as variáveis TGO e TGP foram influenciados pela distância percorrida ($p = 0,0010$ para TGO e $p = 0,0030$ para TGP). As diferenças entre distâncias específicas detectadas pelo teste LSD de Fisher são mostradas nas Tabelas 27 e 28. Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho, porém o teste T para amostras

dependentes indicou diferenças significativas nas comparações antes-depois apenas para a distância de 6-7 Km ($p=0,0499$ para TGO e $p=0,0300$ para TGP).

Tabela 27 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de TGO e as diferentes faixas de distância percorrida (em Km).

Distância percorrida	4-5	6-7	8-10	16-21
4-5		0,3575	0,0008	0,0051
6-7	0,3575		0,0174	0,0231
8-10	0,0008	0,0174		0,4003
16-21	0,0051	0,0231	0,4003	

Os p-valores significativos ($p<0,05$) e altamente significativos ($p<0,01$) foram destacados em vermelho.

Tabela 28 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de TGP e as diferentes faixas de distância percorrida (em Km).

Distância percorrida	4-5	6-7	8-10	16-21
4-5		0,0280	0,0111	0,0017
6-7	0,0280		0,6489	0,0537
8-10	0,0111	0,6489		0,1029
16-21	0,0017	0,0537	0,1029	

Os p-valores significativos ($p<0,05$) e altamente significativos ($p<0,01$) foram destacados em vermelho.

Com relação à CPK a análise de variância indicou que nem o tratamento com pequi nem a distância percorrida influenciaram, pelos altos p-valores observados. Para o teste do cometa, os resultados também indicaram influência da distância percorrida sobre o ID controle ($p=0,0005$). As diferenças entre distâncias específicas detectadas pelo teste LSD de Fisher são mostradas na Tabela 29. Os p-valores significativos ($p<0,05$) e altamente significativos ($p<0,01$) foram destacados em vermelho; no entanto, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas nas comparações antes-depois apenas para as faixas de distância de 6-7 Km ($p=0,0404$) e 8-10 Km ($p=0,0090$).

Tabela 29 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de ID controle e as diferentes faixas de distância percorrida (em Km).

Distância percorrida	4–5	6–7	8–10	16–21
4–5		0,0367	0,0597	0,0260
6–7	0,0367		0,0003	0,2733
8–10	0,0597	0,0003		0,0016
16–21	0,0260	0,2733	0,0016	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

Quanto aos tratamentos com H_2O_2 os resultados da análise de variância indicaram que, para o ID 250 μ M houve influência apenas da distância percorrida ($p=0,0002$), enquanto o ID 1mM não foi influenciado nem pelo tratamento com as cápsulas de pequi nem pela distância percorrida. O teste T para amostras dependentes mostrou diferenças significativas nas comparações antes-depois no ID 250 μ M exclusivamente para a distância de 16–21 Km ($p=0,0235$).

O modelo de análise de variância usado para verificar a influência dos genótipos mostrou que não houve interação entre os fatores tratamento e genótipos para os testes utilizados (TGO, TGP, CPK e cometa). Sendo assim, prosseguiu-se separadamente com as análises. Nos casos em que os efeitos das variáveis consideradas foram diferentes de zero, utilizou-se o teste LSD de Fisher.

Para haptoglobina, CAT e GPX1, a análise de variância indicou efeito nulo dos genótipos nos valores das variáveis TGO, TGP, CPK e cometa (ID controle, ID 250 μ M e ID 1mM) ou seja, os genótipos de haptoglobina, CAT e GPX1 não influenciaram na resposta ao tratamento com as cápsulas de pequi. Consequentemente as análises e conclusões foram as mesmas obtidas quando não se levou em consideração o genótipo.

Já no caso da Mn-SOD, a análise de variância indicou influência dos genótipos nos valores das variáveis TGO ($p=0,0080$), TGP ($p=0,0122$) e ID controle ($p=0,0167$). O teste LSD de Fisher mostrou diferenças entre os genótipos 1-1 e 1-2 para TGO ($p=0,0019$) e TGP ($p=0,0304$) e entre os genótipos 1-1 e 2-2 ($p=0,0192$) e 1-2 e 2-2 ($p=0,0048$) para o teste do cometa (ID controle). No entanto, nas comparações antes-depois o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas apenas para o genótipo 1-2 nos valores de TGO ($p=0,0150$) e ID controle ($p=0,0004$), cujos valores diminuiram após o tratamento com pequi; para TGP poderíamos considerar resultado semelhante se usados níveis de significância superiores a 5,88%. As influências dos genótipos de Mn-SOD nas dosagens séricas de TGO e TGP no índice de danos no DNA (ID controle – teste do cometa) do grupo total antes e após a suplementação com o óleo de pequi são mostradas nas Figuras 8 e 9.

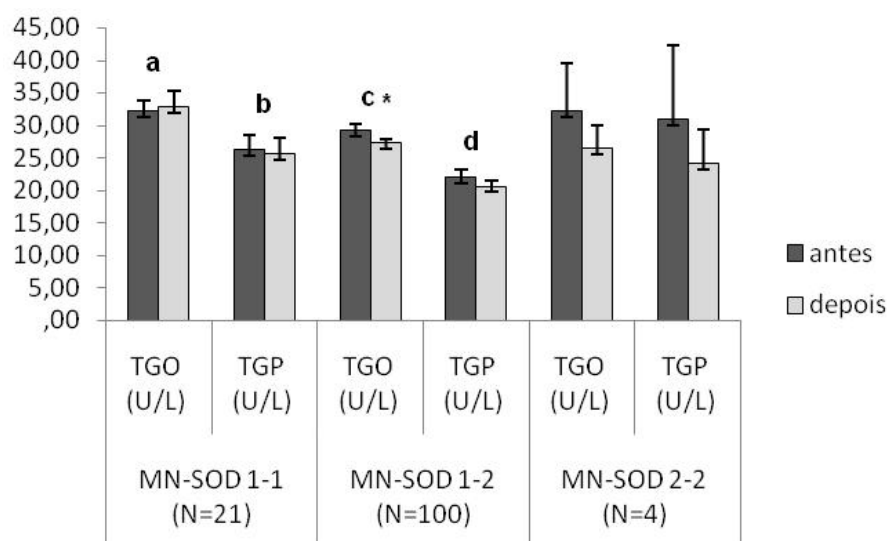


Figura 8 – Influência dos genótipos de Mn-SOD nas dosagens séricas de TGO e TGP antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo a = significativo em relação a c; b = significativo em relação a d. O asterisco indica diferença significativa (* $p < 0,05$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

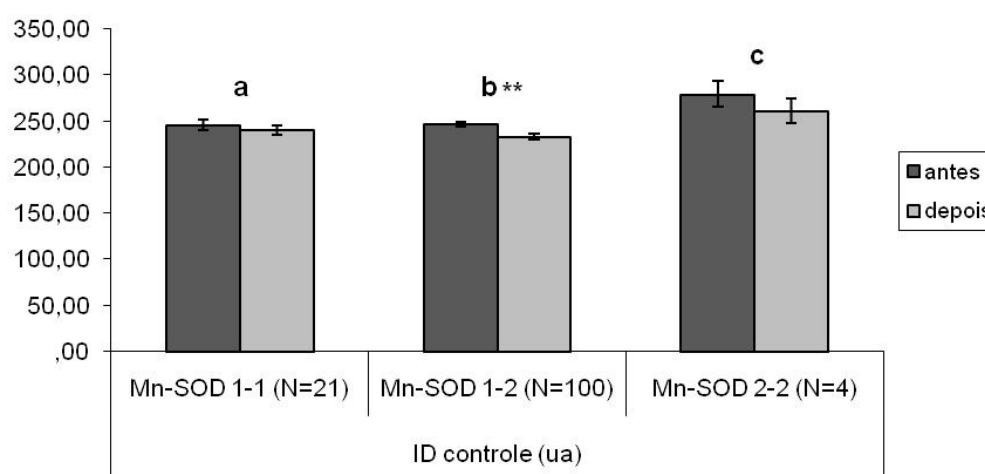


Figura 9 – Influência dos genótipos de Mn-SOD no índice de danos no DNA (ID controle – teste do cometa) antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média) e os valores de ID são dados em unidades arbitrárias (ua). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo a = significativo em relação a c; b = significativo em relação a c. Os asteriscos indicam diferenças altamente significativas (** $p < 0,01$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

5.3.2.2. Hemograma

As influências da suplementação com óleo de pequi nas variáveis do hemograma são apresentadas nas Tabelas 30 e 31. No eritrograma houve uma tendência geral de redução de hemácias, de hemoglobina, de hematócrito e da anisocitose (avaliada pelo RDW, do inglês *Red Cell Distribution Width*), bem como de aumento nos valores das médias dos índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração hemoglobínica corpuscular média), tanto no grupo total quanto para os sexos, exceto VCM para o grupo de mulheres (Tabela 30). No leucograma houve uma tendência geral de redução de linfócitos e de segmentados, assim como de aumento de monócitos, tanto para o grupo total quanto para os sexos, não havendo alteração nas médias dos valores de bastonetes. Tendência geral de redução nos valores da média também foi observada para as plaquetas, tanto para o grupo total quanto para os sexos após a suplementação com o óleo de pequi (Tabela 31). No eritrograma do grupo total, os resultados do teste T para amostras dependentes foram significativos para a redução de hemácias ($p=0,0007$), de hematócrito ($p=0,0011$) e de RDW ($p=0,0000$) e para o aumento nos valores de HCM ($p=0,0001$) e de CHCM ($p=0,0002$). Nos demais exames, os resultados do teste T para o grupo total foram significativos para aumento de monócitos ($p=0,0097$) e redução de plaquetas ($p=0,0005$).

Uma vez que a não homogeneidade da variância inviabilizou as análises de bastonetes, não sendo possível afirmar nada além da análise descritiva, cujas médias praticamente não se alteraram antes ($26,02 \pm 7,62$) e depois ($26,90 \pm 7,70$) do pequi, esta variável não será apresentada.

Tabela 30 – Influências da suplementação com óleo de pequi nos valores das variáveis do eritrograma do grupo total e por sexo.

	Hemácias (milhões/mm ³)		Hemoglobina (g/dL)		Hematócrito (%)		VCM (fl)		HCM (pg)		CHCM (g/% ou g/dL)		RDW (%)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Total (N=119)	5,23 ± 0,05	5,15 ± 0,05**	14,47 ± 0,27	14,41 ± 0,28	45,01 ± 0,34	44,33 ± 0,33**	86,25 ± 0,35	86,29 ± 0,35	29,46 ± 0,14	29,79 ± 0,14**	34,16 ± 0,09	34,53 ± 0,06**	14,84 ± 0,09	14,26 ± 0,10**
Homens (N=74)	5,47 ± 0,05	5,40 ± 0,05**	14,83 ± 0,39	14,77 ± 0,39	46,85 ± 0,33	46,25 ± 0,31*	85,79 ± 0,46	85,93 ± 0,48	29,33 ± 0,19	29,61 ± 0,19**	34,18 ± 0,11	34,47 ± 0,08*	14,96 ± 0,12	14,18 ± 0,11**
Mulheres (N=45)	4,83 ± 0,05	4,75 ± 0,05*	13,88 ± 0,33	13,81 ± 0,33	41,98 ± 0,46	41,17 ± 0,42*	86,99 ± 0,49	86,89 ± 0,47	29,68 ± 0,21	30,08 ± 0,19*	34,12 ± 0,16	34,63 ± 0,09**	14,65 ± 0,14	14,38 ± 0,18

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; RDW = amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos; do inglês *Red Cell Distribution Width*; g/dL= gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; g/%=gramas por porcentagem. Os asteriscos indicam diferenças significativas (*p<0,05) e altamente significativas (**p<0,01) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

Tabela 31 – Influências da suplementação com óleo de pequi nos valores das variáveis do leucograma e das plaquetas do grupo total e por sexo.

	Leucócitos totais (/mm ³)		Linfócitos (/mm ³)		Segmentados (/mm ³)		Monócitos (/mm ³)		Plaquetas (mil/mm ³)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Total (N=119)	7449,15 ± 207,22	7470,34 ± 178,91	2671,08 ± 89,20	2624,26 ± 92,10	4017,89 ± 159,85	3976,42 ± 133,07	497,07 ± 20,41	549,18 ± 18,99**	335,27 ± 6,34	312,16 ± 5,92**
Homens (N=74)	7391,78 ± 237,25	7394,52 ± 226,14	2737,96 ± 110,53	2668,45 ± 114,95	3871,44 ± 188,62	3855,45 ± 174,32	509,15 ± 27,47	555,82 ± 25,41	336,72 ± 7,99	309,65 ± 7,26**
Mulheres (N=45)	7542,22 ± 386,90	7593,33 ± 294,76	2562,58 ± 150,41	2552,58 ± 154,55	4255,47 ± 285,74	4172,67 ± 203,47	477,47 ± 29,81	538,40 ± 28,22**	332,89 ± 10,50	316,29 ± 10,19*

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média). Os asteriscos indicam diferenças significativas (*p<0,05) e altamente significativas (**p<0,01) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

O modelo de análise de variância usado para verificar a influência da variável sexo mostrou que não houve interação entre os fatores tratamento com as cápsulas de pequi e categorias da variável sexo (homens e mulheres) para as variáveis analisadas no hemograma. Sendo assim, prosseguiu-se separadamente com as análises. Nos casos em que os efeitos das variáveis consideradas foram diferentes de zero, utilizou-se o teste LSD de Fisher. Os p-valores obtidos na análise de variância do hemograma indicaram que apenas a variável sexo influenciou nos resultados obtidos com hemácias ($p < 0,0001$), hemoglobina ($p = 0,0169$), hematócrito ($p < 0,0001$), VCM ($p = 0,0333$) e HCM ($p = 0,0471$). Por outro lado, os resultados indicaram que apenas o tratamento com pequi influenciou os resultados de RDW ($p = 0,0002$) e plaquetas ($p = 0,0130$). Quanto à CHCM, apesar dos resultados terem indicado influência do tratamento com pequi ($p = 0,0005$), uma suposição do modelo não foi aceita (constância da variância do erro aleatório). Logo, não foi possível afirmar nada além da análise descritiva para esta variável. Para leucócitos totais, linfócitos e segmentados a análise de variância indicou que nem o tratamento com pequi nem o sexo influenciaram nas respostas dessas variáveis. Com respeito aos monócitos, o efeito do tratamento com pequi só pode ser aceito se considerados níveis de significância superiores a 6,28%.

As influências da suplementação com óleo de pequi nos resultados do eritrograma, do leucograma e das plaquetas nas diferentes faixas etárias são apresentadas nas Tabelas 32 e 33. Os resultados seguiram a mesma tendência geral do grupo total, exceto para os valores de hemoglobina, que aumentaram nas faixas etárias de 20–24, 35–39 e 40–44 anos; de VCM, que reduziram nas faixas de 15–19, 25–29 e 40–44 anos; de linfócitos, que aumentaram na faixa etária de 40–44 anos; de segmentados, que aumentaram nas faixas etárias de 15–19 e 30–34; e de monócitos, que reduziram nas faixas etárias de 40–44 anos e ≥ 45 anos após suplementação com pequi.

Tabela 32 – Influências da suplementação com óleo de pequi nos resultados do eritrograma nas diferentes faixas etárias.

Faixa etária	Hemácias (milhões/mm ³)		Hemoglobina (g/dL)		Hematócrito (%)		VCM (fl)		HCM (pg)		CHCM (g/% ou g/dL)		RDW (%)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
15-19 (N=20)	5,35 ± 0,12	5,17 ± 0,13**	15,50 ± 0,27	15,07 ± 0,29*	45,35 ± 0,83	43,71 ± 0,88**	84,92 ± 0,80	84,84 ± 0,78	29,05 ± 0,34	29,28 ± 0,33	34,18 ± 0,16	34,51 ± 0,13	14,25 ± 0,19	14,26 ± 0,24
20-24 (N=24)	5,26 ± 0,10	5,22 ± 0,10	14,10 ± 0,74	14,15 ± 0,76	45,24 ± 0,77	44,96 ± 0,81	86,16 ± 0,82	86,23 ± 0,81	29,45 ± 0,32	29,82 ± 0,35	34,20 ± 0,20	34,58 ± 0,15	14,86 ± 0,21	14,24 ± 0,23**
25-29 (N=23)	5,35 ± 0,11	5,24 ± 0,11*	12,76 ± 0,92	12,69 ± 0,95	45,97 ± 0,80	44,91 ± 0,75*	86,42 ± 0,92	86,32 ± 0,94	29,27 ± 0,34	29,66 ± 0,32	33,88 ± 0,24	34,37 ± 0,13	14,99 ± 0,21	14,02 ± 0,16**
30-34 (N=12)	5,22 ± 0,16	5,16 ± 0,14	14,59 ± 0,97	14,55 ± 0,94	44,96 ± 1,20	44,74 ± 1,02	86,31 ± 0,84	86,87 ± 0,95	29,54 ± 0,38	29,87 ± 0,44	34,22 ± 0,29	34,38 ± 0,24	14,77 ± 0,17	13,91 ± 0,25*
35-39 (N=15)	5,26 ± 0,13	5,20 ± 0,12	15,07 ± 0,36	15,17 ± 0,35	44,37 ± 1,04	43,99 ± 1,03	84,43 ± 1,00	84,59 ± 1,03	28,67 ± 0,41	29,20 ± 0,34**	33,96 ± 0,30	34,53 ± 0,16*	15,23 ± 0,35	14,77 ± 0,42
40-44 (N=09)	5,08 ± 0,11	5,05 ± 0,09	15,19 ± 0,33	15,30 ± 0,29	44,49 ± 1,01	44,06 ± 0,79	87,59 ± 0,70	87,29 ± 0,70	29,93 ± 0,37	30,32 ± 0,30	34,18 ± 0,33	34,74 ± 0,18	14,60 ± 0,29	14,01 ± 0,29*
≥45 (N=16)	4,94 ± 0,09	4,90 ± 0,09	15,16 ± 0,36	15,11 ± 0,34	43,79 ± 0,93	43,50 ± 0,90	88,68 ± 0,65	88,76 ± 0,68	30,68 ± 0,31	30,79 ± 0,32	34,60 ± 0,21	34,70 ± 0,17	15,18 ± 0,18	14,54 ± 0,18*

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; RDW = amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos; do inglês *Red Cell Distribution Width*; g/dL= gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; g/%=gramas por porcentagem. Os asteriscos indicam diferenças significativas (*p<0,05) e altamente significativas (**p<0,01) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

Tabela 33 – Influências da suplementação com óleo de pequi nos resultados do leucograma e das plaquetas nas diferentes faixas etárias.

Faixa etária	Leucócitos totais (/mm ³)		Linfócitos (/mm ³)		Segmentados (/mm ³)		Monócitos (/mm ³)		Plaquetas (mil/mm ³)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
15-19 (N=20)	7180,00 ± 348,88	7420,00 ± 398,85	2750,35 ± 207,54	2740,75 ± 292,04	3693,65 ± 222,97	3799,15 ± 258,84	490,75 ± 45,69	587,35 ± 45,92	322,80 ± 16,34	320,95 ± 16,42
20-24 (N=24)	7826,09 ± 587,36	7873,91 ± 379,47	2731,96 ± 208,32	2680,67 ± 202,63	4256,33 ± 454,93	4247,04 ± 298,69	570,29 ± 59,24	644,13 ± 33,4	316,04 ± 11,63	290,42 ± 10,81*
25-29 (N=23)	7978,26 ± 347,60	7739,13 ± 366,68	2943,74 ± 223,27	2882,43 ± 180,61	4244,87 ± 260,01	4054,13 ± 288,36	500,26 ± 42,27	512,00 ± 39,14	350,35 ± 13,98	315,17 ± 10,29**
30-34 (N=12)	6391,67 ± 485,93	7608,33 ± 820,33	2416,58 ± 286,93	2523,58 ± 339,29	3317,00 ± 357,48	4240,83 ± 605,04	395,75 ± 62,64	572,67 ± 79,61*	332,33 ± 15,16	304,00 ± 17,69*
35-39 (N=15)	7700,00 ± 828,61	7385,71 ± 549,61	2667,64 ± 216,26	2426,29 ± 207,91	4287,36 ± 745,67	4001,29 ± 503,19	477,29 ± 51,00	489,93 ± 32,42	376,33 ± 22,48	337,93 ± 23,04*
40-44 (N=09)	7555,56 ± 413,36	6988,89 ± 244,63	2621,00 ± 211,34	2820,44 ± 288,75	4197,33 ± 340,97	3429,56 ± 138,37	473,22 ± 53,62	458,67 ± 39,50	336,44 ± 22,20	309,89 ± 21,31
≥45 (N=16)	6968,75 ± 686,22	6693,75 ± 546,08	2310,75 ± 265,48	2161,31 ± 205,57	3928,19 ± 442,55	3767,94 ± 323,82	497,25 ± 52,32	497,63 ± 70,63	321,06 ± 17,21	312,69 ± 15,98

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média). Os asteriscos indicam diferenças significativas (*p<0,05) e altamente significativas (**p<0,01) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

O modelo de análise de variância usado para verificar a influência da faixa etária mostrou que não houve interação entre os fatores tratamento e idade para as variáveis analisadas no hemograma. Sendo assim, prosseguiu-se separadamente com as análises. Nos casos em que os efeitos das variáveis consideradas foram diferentes de zero, utilizou-se o teste LSD de Fisher.

Os p-valores obtidos na análise de variância do hemograma indicaram que apenas a faixa etária influenciou nos resultados obtidos com hemácias ($p=0,0287$), hemoglobina ($p=0,0007$), VCM ($p=0,0001$) e HCM ($p<0,0001$). As diferenças entre as faixas etárias detectadas pelo teste LSD de Fisher para estas variáveis são mostradas nas Tabelas 34, 35, 36 e 37. Os p-valores significativos ($p<0,05$) e altamente significativos ($p<0,01$) foram destacados em vermelho e indicaram que, em níveis de significância inferiores a 5%, as variáveis em questão (hemácias, hemoglobina, VCM e HCM) apresentaram valores distintos entre as faixas-etárias apresentadas nas tabelas.

Tabela 34 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de hemácias e as diferentes faixas etárias (em anos).

Faixas etárias	15–19	20–24	25–29	30–34	35–39	40–44	≥ 45 anos
15–19		0,0093	0,0730	0,0001	0,6769	0,1864	0,7156
20–24	0,0093		0,3846	0,0658	0,0042	0,4659	0,0043
25–29	0,0730	0,3846		0,0114	0,0347	0,9428	0,0367
30–34	0,0001	0,0658	0,0114		<0,0001	0,0323	<0,0001
35–39	0,6769	0,0042	0,0347	<0,0001		0,1065	0,9552
40–44	0,1864	0,4659	0,9428	0,0323	0,1065		0,1132
≥ 45 anos	0,7156	0,0043	0,0367	<0,0001	0,9552	0,1132	

Os p-valores significativos ($p<0,05$) e altamente significativos ($p<0,01$) foram destacados em vermelho.

Para a variável hemácias, a faixa etária que apresentou maior diferença em relação às demais foi a de 30–34 anos, enquanto a que menos apresentou diferenças foi a de 40–44 anos. No entanto, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas nas comparações antes-depois para as faixas etárias de 15–19 anos ($p=0,0067$) e 25–29 anos ($p=0,0451$).

Tabela 35 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de hemoglobina e as diferentes faixas etárias (em anos).

Faixas etárias	15–19	20–24	25–29	30–34	35–39	40–44	≥ 45 anos
15–19		0,0652	<0,0001	0,3452	0,8156	0,9611	0,8284
20–24	0,0652		0,0215	0,5424	0,1450	0,1673	0,1317
25–29	<0,0001	0,0215		0,0130	0,0006	0,0022	0,0004
30–34	0,3452	0,5424	0,0130		0,4935	0,4608	0,4761
35–39	0,8156	0,1450	0,0006	0,4935		0,8867	0,9846
40–44	0,9611	0,1673	0,0022	0,4608	0,8867		0,8985
≥ 45 anos	0,8284	0,1317	0,0004	0,4761	0,9846	0,8985	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

Os resultados do teste LSD de Fisher para a variável hemoglobina indicaram que a faixa etária de 25–29 anos diferiu de todas as outras. Porém, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas nas comparações antes-depois apenas para a faixa etária de 15–19 anos ($p = 0,0140$).

Tabela 36 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de VCM e as diferentes faixas etárias (em anos).

Faixas etárias	15–19	20–24	25–29	30–34	35–39	40–44	≥ 45 anos
15–19		0,0935	0,0611	0,0718	0,6781	0,0145	<0,0001
20–24	0,0935		0,8227	0,6708	0,0488	0,2213	0,0028
25–29	0,0611	0,8227		0,8115	0,0317	0,2936	0,0057
30–34	0,0718	0,6708	0,8115		0,0394	0,4566	0,0319
35–39	0,6781	0,0488	0,0317	0,0394		0,0078	<0,0001
40–44	0,0145	0,2213	0,2936	0,4566	0,0078		0,2355
≥ 45 anos	<0,0001	0,0028	0,0057	0,0319	<0,0001	0,2355	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

Para a variável VCM, os resultados acima indicaram que as faixas etárias de 35–39 e ≥ 45 anos foram as que apresentaram maiores diferenças em relação às demais. Nenhuma diferença significativa foi detectada pelo teste T para amostras dependentes em qualquer faixa etária.

Tabela 37 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de HCM e as diferentes faixas etárias (em anos).

Faixas etárias	15–19	20–24	25–29	30–34	35–39	40–44	≥ 45 anos
15–19		0,1322	0,3413	0,1530	0,5299	0,0212	<0,0001
20–24	0,1322		0,5703	0,8518	0,0423	0,2268	0,0012
25–29	0,3413	0,5703		0,5154	0,1284	0,1052	0,0002
30–34	0,1530	0,8518	0,5154		0,0578	0,3563	0,0101
35–39	0,5299	0,0423	0,1284	0,0578		0,0071	<0,0001
40–44	0,0212	0,2268	0,1052	0,3563	0,0071		0,1627
≥ 45 anos	<0,0001	0,0012	0,0002	0,0101	<0,0001	0,1627	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

Os resultados indicaram que a faixa etária ≥ 45 anos foi a que mais se diferenciou das outras. Entretanto, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas nas comparações antes-depois apenas para a faixa etária de 35–39 anos ($p = 0,0084$).

Para hematócrito, leucócitos totais, linfócitos, segmentados e monócitos a análise de variância indicou que nem o tratamento com o pequi nem a faixa etária exerceram influência. Quanto à variável CHCM, apesar dos resultados terem indicado influência do tratamento com pequi ($p = 0,0015$), uma suposição do modelo não foi aceita (constância da variância do erro aleatório). Logo, não foi possível afirmar nada além da análise descritiva para esta variável. Os resultados com RDW indicaram que tanto o tratamento com pequi ($p < 0,0001$) quanto a faixa etária ($p = 0,0277$) exerceram influência sobre a variável. Resultado semelhante foi obtido com plaquetas, sendo que os p-valores obtidos foram de $p = 0,0103$ para o tratamento com pequi e $p = 0,0383$ para a faixa etária. As diferenças entre as faixas etárias detectadas pelo teste LSD de Fisher para as variáveis RDW e plaquetas são mostradas nas Tabelas 38 e 39. Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho e indicaram que, em níveis de significância inferiores a 5%, as variáveis RDW e plaquetas apresentaram valores distintos entre as faixas-etárias apresentadas nas tabelas.

Tabela 38 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de RDW e as diferentes faixas etárias (em anos).

Faixas etárias	15–19	20–24	25–29	30–34	35–39	40–44	≥ 45 anos
15–19		0,1686	0,2555	0,7455	0,0025	0,8538	0,0127
20–24	0,1686		0,8115	0,3978	0,0588	0,3795	0,1897
25–29	0,2555	0,8115		0,5192	0,0374	0,4858	0,1303
30–34	0,7455	0,3978	0,5192		0,0178	0,9195	0,0592
35–39	0,0025	0,0588	0,0374	0,0178		0,0224	0,5772
40–44	0,8538	0,3795	0,4858	0,9195	0,0224		0,0664
≥ 45 anos	0,0127	0,1897	0,1303	0,0592	0,5772	0,0664	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

Os resultados acima indicaram que a faixa etária de 35–39 anos foi a que mais apresentou diferenças em relação às demais, só não diferindo das faixas de 20–24 anos e ≥ 45 anos. Já a faixa etária de 20–24 anos não apresentou diferenças em relação a nenhuma outra. O teste T para amostras dependentes indicou diferenças nas comparações antes-depois para as faixas etárias de 20–24 anos ($p=0,0066$), 25–29 anos ($p=0,0011$), 30–34 anos ($p=0,0136$), 40–44 anos ($p=0,0368$) e ≥ 45 anos ($p=0,0228$).

Tabela 39 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de plaquetas e as diferentes faixas etárias (em anos).

Faixas etárias	15–19	20–24	25–29	30–34	35–39	40–44	≥ 45 anos
15–19		0,1905	0,4485	0,8288	0,0288	0,9454	0,7509
20–24	0,1905		0,0320	0,3686	0,0006	0,2779	0,3683
25–29	0,4485	0,0320		0,3831	0,1188	0,6034	0,2992
30–34	0,8288	0,3686	0,3831		0,0330	0,8092	0,9426
35–39	0,0288	0,0006	0,1188	0,0330		0,0872	0,0177
40–44	0,9454	0,2779	0,6034	0,8092	0,0872		0,7478
≥ 45 anos	0,7509	0,3683	0,2992	0,9426	0,0177	0,7478	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

Para plaquetas, a faixa etária que mais se diferenciou das outras foi a de 35–39 anos, enquanto a faixa de 40–44 anos não apresentou diferenças em relação às demais. O teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas nas comparações antes-depois para as faixas etárias de 20–24 ($p=0,0289$), 25–29 ($p=0,0006$), 30–34 ($p=0,0143$) e 35–39 anos ($p=0,0256$).

As influências da suplementação com óleo de pequi nos resultados do eritrograma, do leucograma e das plaquetas nas diferentes faixas de distância percorrida são apresentadas nas Tabelas 40 e 41. Os resultados seguiram a mesma tendência do grupo total, exceto para os valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito, que aumentaram na distância de 16–21 Km; de leucócitos totais e monócitos, que diminuíram na distância de 16–21 Km; de linfócitos, que aumentaram na distância de 6–7 Km; e de segmentados, que aumentaram na distância de 4–5 Km.

O modelo de análise de variância usado para verificar a influência da distância percorrida mostrou que não houve interação entre os fatores tratamento e quilômetros percorridos para as variáveis analisadas no hemograma. Sendo assim, prosseguiu-se separadamente com as análises. Nos casos em que os efeitos das variáveis consideradas foram diferentes de zero, utilizou-se o teste LSD de Fisher.

Os p-valores obtidos na análise de variância do hemograma indicaram que nenhum dos fatores (tratamento com pequi e distância percorrida) influenciou nos resultados obtidos com hemácias, hematócrito, VCM, HCM, leucócitos totais, segmentados, linfócitos e monócitos. Para a variável hemoglobina, os resultados indicaram que apenas a distância percorrida exerceu influência ($p=0,0220$). Para RDW e plaquetas, ambos os fatores (tratamento com pequi e distância percorrida) influenciaram, sendo que os p-valores para RDW foram de $p=0,0002$ para tratamento com pequi e $p<0,0001$ para distância percorrida; e para plaquetas foram de $p=0,0140$ para tratamento com pequi e $p=0,0075$ para distância percorrida. As diferenças entre as distâncias percorridas detectadas pelo teste LSD de Fisher para as variáveis hemoglobina, RDW, plaquetas são mostradas nas Tabelas 42, 43 e 44. Os p-valores significativos ($p<0,05$) e altamente significativos ($p<0,01$) foram destacados em vermelho e indicaram que, em níveis de significância inferiores a 5%, as variáveis em questão apresentaram valores distintos entre as distâncias percorridas apresentadas nas tabelas. Apesar dos resultados para CHCM terem indicado influência do efeito do tratamento com pequi ($p=0,0122$), uma suposição do modelo não foi aceita (constância da variância do erro aleatório). Consequentemente, não foi possível afirmar nada além da análise descritiva para esta variável.

Tabela 40 – Influências da suplementação com óleo de pequi nos resultados do eritrograma nas diferentes faixas de distância percorrida.

Distância percorrida (Km)	Hemácias (milhões/mm ³)		Hemoglobina (g/dL)		Hematócrito (%)		VCM (fl)		HCM (pg)		CHCM (g/% ou g/dL)		RDW (%)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
4-5 (N=49)	5,32 ± 0,08	5,21 ± 0,08**	13,81 ± 0,56	13,66 ± 0,57	45,53 ± 0,57	44,55 ± 0,56**	85,74 ± 0,61	85,76 ± 0,60	29,30 ± 0,24	29,59 ± 0,25*	34,16 ± 0,13	34,50 ± 0,09*	14,53 ± 0,14	13,98 ± 0,13**
6-7 (N=33)	5,12 ± 0,07	5,08 ± 0,07	15,10 ± 0,19	15,10 ± 0,20	44,28 ± 0,50	44,09 ± 0,58	86,84 ± 0,48	87,04 ± 0,52	29,58 ± 0,18	29,82 ± 0,19	34,10 ± 0,19	34,26 ± 0,11	14,80 ± 0,15	14,20 ± 0,18**
8-10 (N=30)	5,25 ± 0,10	5,15 ± 0,08**	14,79 ± 0,52	14,74 ± 0,50	45,42 ± 0,74	44,49 ± 0,62*	86,68 ± 0,62	86,53 ± 0,63	29,62 ± 0,29	30,15 ± 0,25**	34,17 ± 0,20	34,84 ± 0,09**	15,04 ± 0,16	14,44 ± 0,17**
16-21 (N=07)	5,05 ± 0,13	5,07 ± 0,18	14,81 ± 0,58	14,97 ± 0,58	43,03 ± 1,58	43,26 ± 1,77	85,09 ± 2,11	85,41 ± 2,14*	29,30 ± 0,87	29,56 ± 0,76	34,40 ± 0,33	34,64 ± 0,26	16,34 ± 0,38	15,69 ± 0,64

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; RDW = amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos; do inglês *Red Cell Distribution Width*; g/dL= gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; g/%=gramas por porcentagem. Os asteriscos indicam diferenças significativas (*p<0,05) e altamente significativas (**p<0,01) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

Tabela 41 – Influências da suplementação com óleo de pequi nos resultados do leucograma e das plaquetas nas diferentes faixas de distância percorrida. Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média).

Distância percorrida (Km)	Leucócitos totais (/mm ³)		Linfócitos (/mm ³)		Segmentados (/mm ³)		Monócitos (/mm ³)		Plaquetas (mil/mm ³)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
4-5 (N=49)	7372,92 ± 253,95	7737,50 ± 270,30	2818,94 ± 134,56	2785,47 ± 144,47	3793,84 ± 163,80	4099,14 ± 198,04	514,04 ± 34,47	602,20 ± 27,39*	324,94 ± 8,97	310,16 ± 8,12
6-7 (N=33)	6936,36 ± 402,97	6863,64 ± 278,01	2284,48 ± 160,56	2494,85 ± 151,15	3908,42 ± 347,97	3445,73 ± 242,85	459,73 ± 37,93	489,18 ± 38,65	328,39 ± 10,42	302,33 ± 10,54**
8-10 (N=30)	7913,33 ± 510,41	7730,00 ± 417,27	2810,47 ± 188,84	2493,60 ± 215,10	4342,37 ± 370,51	4414,40 ± 252,84	499,57 ± 38,62	539,90 ± 38,52	363,03 ± 15,26	332,73 ± 13,70**
16-21 (N=07)	8483,33 ± 951,99	7066,67 ± 857,39	2892,83 ± 267,33	2672,83 ± 207,52	4827,33 ± 1039,38	3703,17 ± 777,14	551,33 ± 46,10	492,50 ± 47,82	321,00 ± 24,82	284,29 ± 28,56

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média). Os asteriscos indicam diferenças significativas (*p<0,05) e altamente significativas (**p<0,01) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

Tabela 42 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de hemoglobina e as diferentes faixas de distância percorrida (em Km).

Distância percorrida	4–5	6–7	8–10	16–21
4–5		0,0043	0,0359	0,1741
6–7	0,0043		0,5252	0,8121
8–10	0,0359	0,5252		0,8837
16–21	0,1741	0,8121	0,8837	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

Os resultados indicaram que a faixa de distância de 4–5 Km diferiu das faixas de 6–7 e 8–10 Km, apresentando valores inferiores de hemoglobina. Nenhuma diferença significativa foi mostrada pelo teste T para amostras dependentes nas comparações antes-depois para qualquer distância.

Tabela 43 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de RDW e as diferentes faixas de distância percorrida (em Km).

Distância percorrida	4–5	6–7	8–10	16–21
4–5		0,1178	0,0023	<0,0001
6–7	0,1178		0,1552	<0,0001
8–10	0,0023	0,1552		<0,0001
16–21	<0,0001	<0,0001	<0,0001	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

A tabela acima mostra que a faixa de 16–21 Km, que apresentou maior anisocitose, diferiu de todas as outras, enquanto a distância de 4–5 Km só diferiu de 8–10 Km, não apresentando diferenças em relação à distância de 6–7 Km. O teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas nas comparações antes-depois para as distâncias de 4–5 Km ($p = 0,0017$), 6–7 Km ($p = 0,0054$) e 8–10 Km ($p = 0,0008$).

Tabela 44 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de plaquetas e as diferentes faixas de distância percorrida (em Km).

Distância percorrida	4–5	6–7	8–10	16–21
4–5		0,0180	<0,0001	0,0083
6–7	0,0180		0,0093	0,1595
8–10	<0,0001	0,0093		0,9530
16–21	0,0083	0,1595	0,9530	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

Os resultados indicaram que a distância de 4–5 Km diferiu de todas as outras e que a distância de 16–21 Km foi a que menos apresentou diferenças em relação às outras. Nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes mostrou diferenças significativas apenas para as distâncias de 6–7 ($p = 0,0002$) e 8–10 Km ($p = 0,0037$).

O modelo de análise de variância usado para verificar a influência genótipos mostrou que não houve interação entre os fatores tratamento e genótipos para as variáveis analisadas no hemograma. Sendo assim, prosseguiu-se separadamente com as análises. Nos casos em que os efeitos das variáveis consideradas foram diferentes de zero, utilizou-se o teste LSD de Fisher.

Para haptoglobina, a análise de variância não rejeitou a nulidade do efeito genótipo nos valores das variáveis VCM, HCM, CHCM, RDW, leucócitos totais, linfócitos, segmentados, monócitos e plaquetas, ou seja, os genótipos de Hp, não influenciaram na resposta destas variáveis (efeito genótipo Hp, nulos). Consequentemente as análises e conclusões foram as mesmas obtidas quando não se levou em consideração genótipo. A análise de variância também indicou que apenas os genótipos Hp exerceram influência nos valores das variáveis hemácias ($p = 0,0061$ para genótipos), hemoglobina ($p = 0,0372$) e hematócrito ($p = 0,0101$). Entretanto, quando foram agrupados os subtipos Hp^{*1} os resultados indicaram efeito nulo dos genótipos nos valores da variável hemoglobina, permanecendo, porém, o efeito dos genótipos nos valores de hemácias ($p = 0,0040$) e de hematócrito ($p = 0,0048$). Para a variável hemácias, o teste LSD de Fisher detectou diferenças entre os genótipos Hp 1F-1F e 1F-2 ($p = 0,0038$), 1S-1S e 1F-2 ($p = 0,0290$), 1F-2 e 2-2 ($p = 0,0005$) e 1S-2 e 2-2 ($p = 0,0291$); para a variável hemoglobina, entre os genótipos 1F-1S e 1S-1S ($p = 0,0229$), 1S-1S e 1S-2 ($p = 0,0063$) e 1S-2 e 2-2 ($p = 0,0220$); e para a variável hematócrito, entre os genótipos 1F-1F e 1F-2 ($p = 0,0052$), 1F-1F e 1S-2 ($p = 0,0250$), 1F-2 e 2-2 ($p = 0,0022$) e 1S-2 e 2-2 ($p = 0,0183$). Entretanto, nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes só indicou diferenças significativas nos valores de hemácias e hematócrito para os genótipos Hp1S-1S ($p = 0,0161$ para hemácias e $p = 0,0266$ para hematócrito) e Hp1S-2 ($p = 0,0210$ para hemácias e $p = 0,0381$ para hematócrito).

As influências dos subtipos Hp na variável hemácias é mostrada na Figura 10.

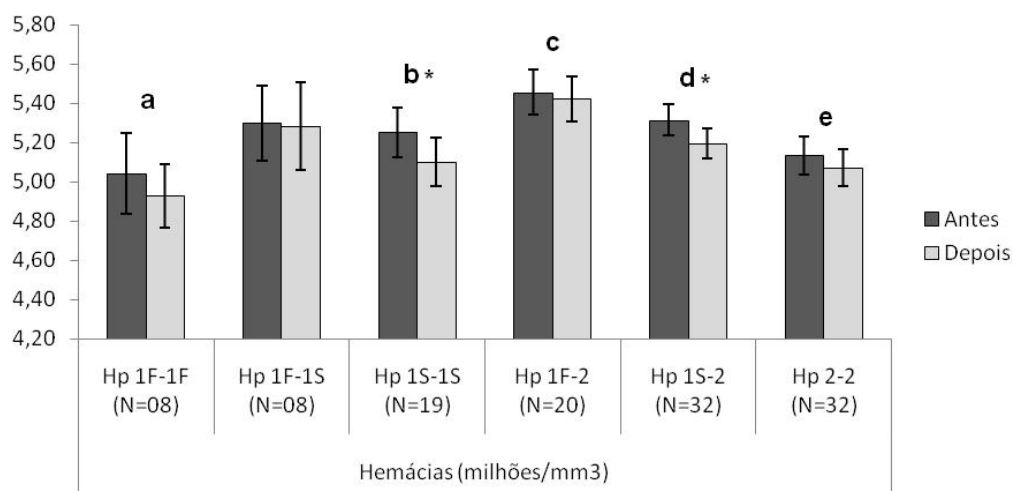


Figura 10 – Influência dos subtipos de Hp na variável hemácias antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **c**; **b** = significativo em relação a **c**; **c** significativo em relação a **e**; **d** significativo em relação a **e**. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,05$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

As influências dos subtipos de Hp nas variáveis hemoglobina e hematócrito são mostradas nas Figuras 11 e 12.

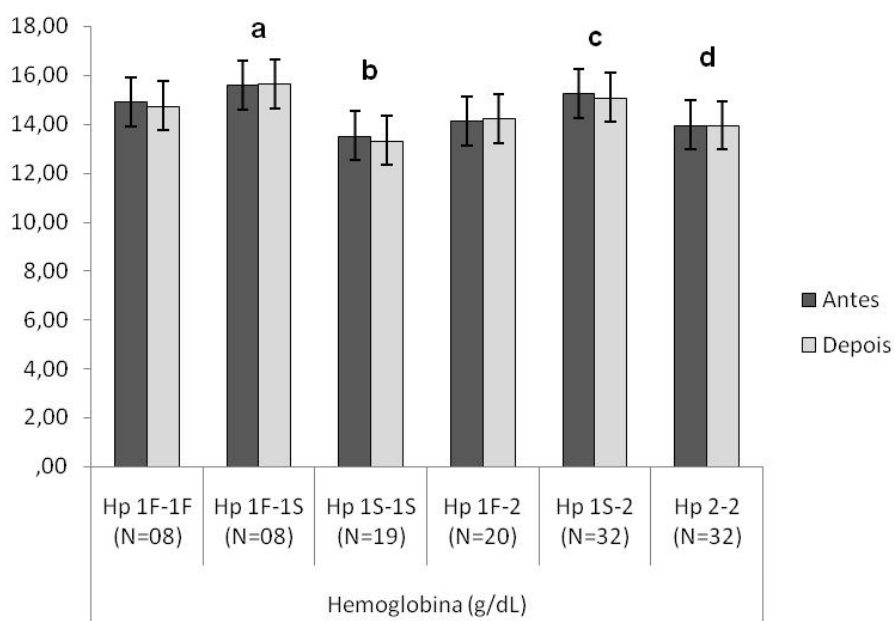


Figura 11 – Influência dos subtipos de Hp na variável hemoglobina antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **b**; **b** = significativo em relação a **c**; **c** significativo em relação a **d**.

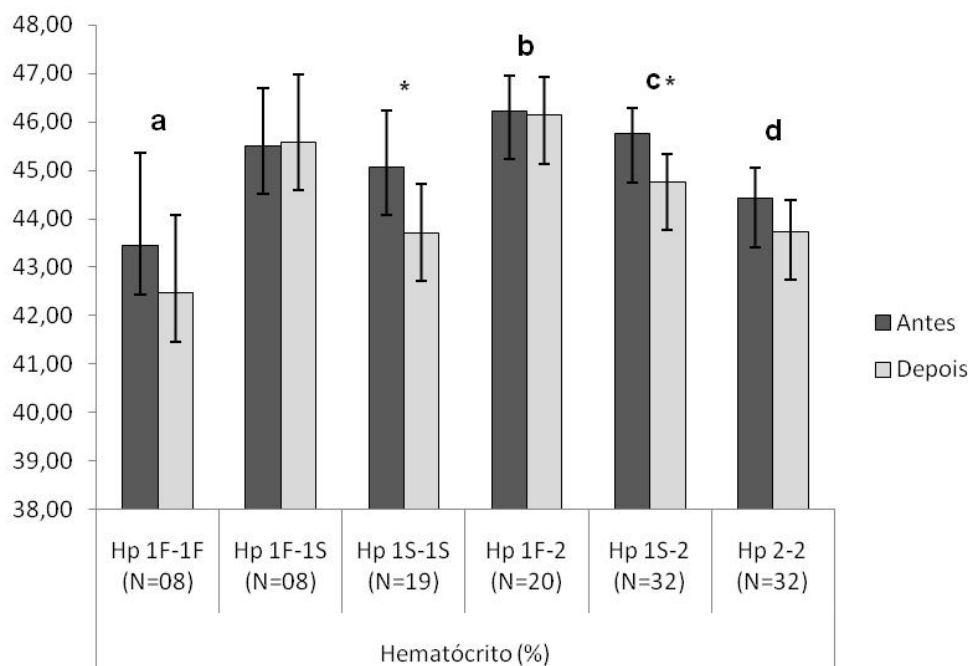


Figura 12 – Influência dos subtipos de Hp na variável hematócrito antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **b** e a **c**; **b** = significativo em relação a **d**; **c** significativo em relação a **d**. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,05$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

Quando os subtipos de Hp^{*1} foram agrupados (tipos de Hp), para hemácias e hematócrito o teste LSD de Fisher detectou diferenças entre Hp1-1 e Hp2-1 ($p = 0,0326$ para hemácias e $p = 0,0276$ para hematócrito) e entre Hp2-1 e Hp2-2 ($p = 0,0015$ para hemácias e $p = 0,0020$ para hematócrito). Porém, nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes apenas mostrou diferenças significativas para Hp1-1 ($p = 0,0314$ para hemácias e $p = 0,0423$ para hematócrito) e Hp2-1 ($p = 0,0182$ para hemácias e $p = 0,0469$ para hematócrito).

As influências dos tipos de Hp nas variáveis hemácias e hematócrito são mostradas nas Figuras 13 e 14.

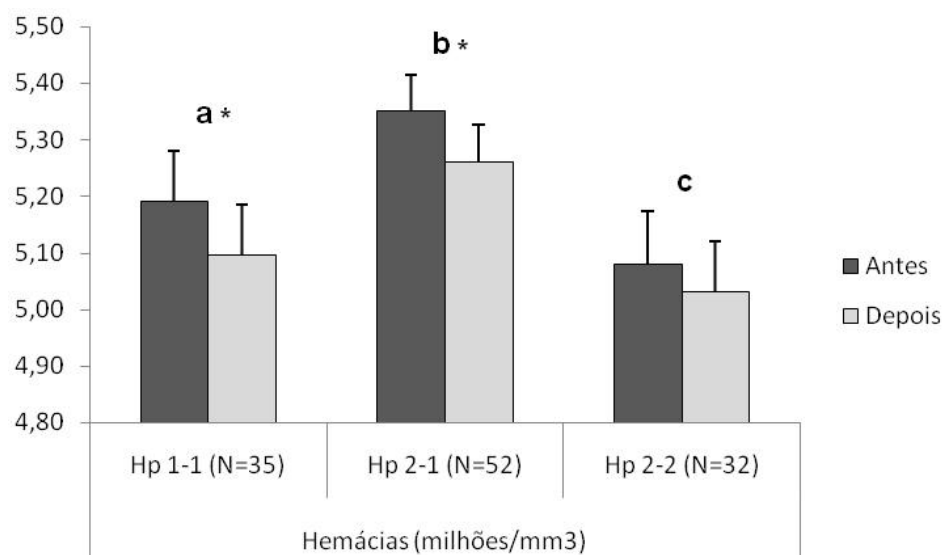


Figura 13 – Influência dos tipos de Hp na variável hemácias antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **b**; **b** = significativo em relação a **c**. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,05$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

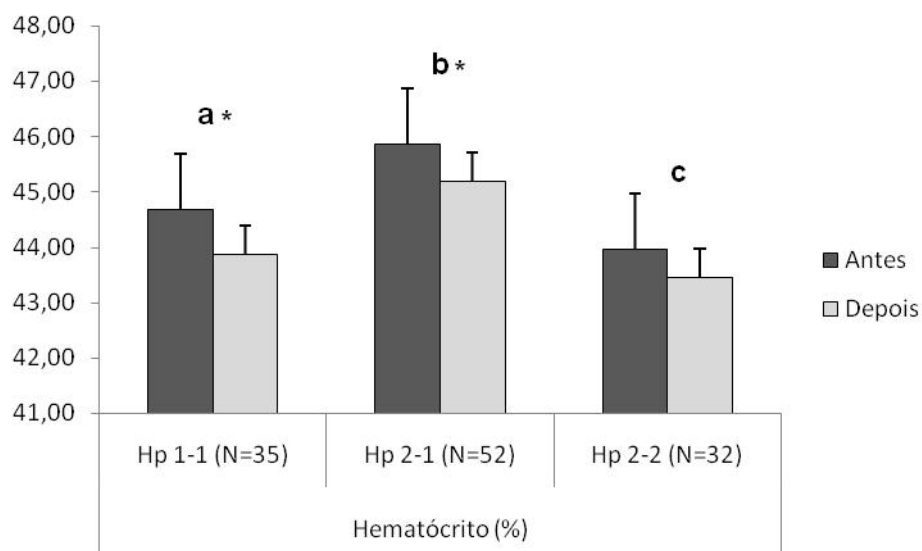


Figura 14 – Influência dos tipos de Hp na variável hematócrito antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **b**; **b** = significativo em relação a **c**. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,05$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

Para Mn-SOD a análise de variância indicou influência dos genótipos apenas nos valores da variável hematócrito ($p=0,0053$), sendo que para as demais variáveis (hemácias, hemoglobina, VCM, HCM, CHCM, RDW, leucócitos totais, linfócitos, segmentados, monócitos e plaquetas) o efeito dos genótipos foi nulo. Para a variável hematócrito, o teste T detectou diferenças entre os genótipos 1-1 e 2-2 ($p=0,0016$) e 1-2 e 2-2 ($p=0,0015$). No entanto, nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes só indicou diferenças significativas para o genótipo 1-2 ($p=0,0006$). A influência dos genótipos Mn-SOD na variável hematócrito é mostrada na Figura 15.

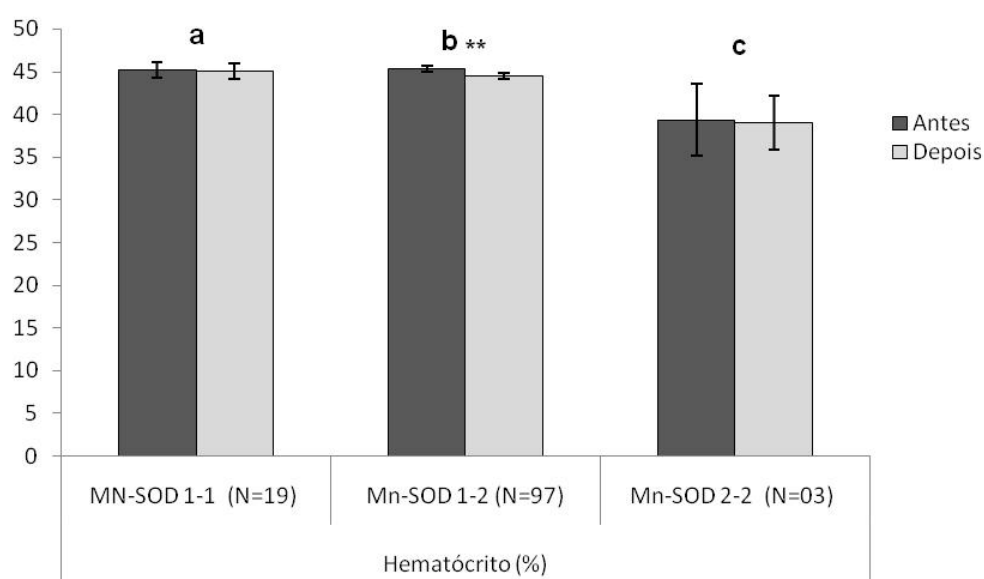


Figura 15 – Influência dos genótipos de Mn-SOD na variável hematócrito.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo a = significativo em relação a c; b = significativo em relação a c. Os asteriscos indicam diferenças altamente significativas ($*p<0,01$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

Para CAT, a análise de variância indicou efeito nulo dos genótipos nos valores das variáveis hemoglobina e segmentados; efeito apenas dos genótipos nos valores das variáveis hemácias ($p=0,0003$), hematócrito ($p=0,0009$), VCM ($p=0,0047$) e HCM ($p=0,0006$); e efeito apenas do tratamento com pequi para as variáveis RDW ($p<0,0001$) e plaquetas ($p=0,0059$). Para as variáveis leucócitos totais, linfócitos e monócitos nem o tratamento com pequi nem os genótipos CAT exerceram influência. Quanto à CHCM, uma suposição do modelo ficou comprometida (constância da variância do erro aleatório) e prejudicou a confiabilidade de qualquer análise por ANOVA. Para a variável hemácias, o teste LSD de Fisher indicou diferenças entre os genótipos AA e AT ($p=0,0176$), AA e TT ($p<0,0001$) e AT e TT ($p=0,0294$); para hematócrito, entre AA e AT ($p=0,3123$), AA e TT ($p=0,0009$) e AT e TT ($p=0,0030$); para VCM, entre AA e AT ($p=0,0015$) e AA e TT ($p=0,0061$); e para HCM, entre AA e AT ($p=0,0003$) e AA e TT ($p=0,0006$).

No entanto, nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes mostrou diferenças significativas apenas nos valores de hemácias, hematócrito e HCM para os genótipos AA ($p=0,0470$ para hemácias, $p=0,0498$ para hematócrito e $p=0,0291$ para HCM) e AT ($p=0,0106$ para hemácias, $p=0,0089$ para hematócrito e $p=0,0003$ para HCM).

As influências dos genótipos CAT nas variáveis hemácias, hematócrito, VCM e HCM são mostradas nas Figuras 16, 17, 18 e 19.

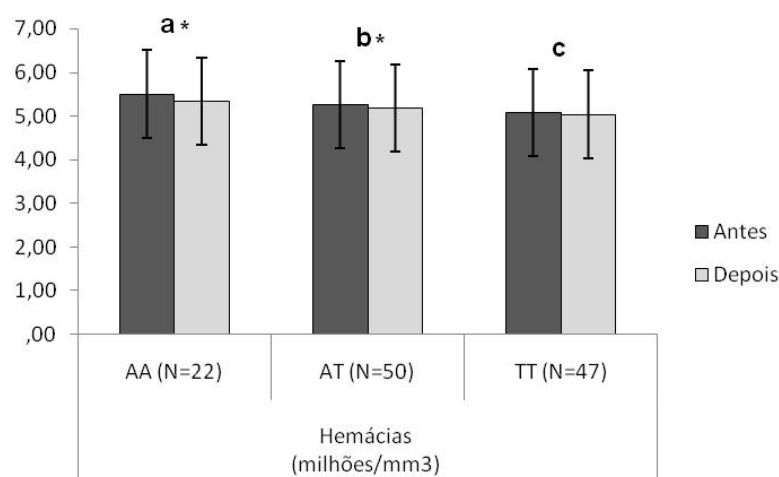


Figura 16 – Influência dos genótipos de CAT na variável hemácias antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **b** e **c**; **b** = significativo em relação a **c**. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($*p<0,05$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

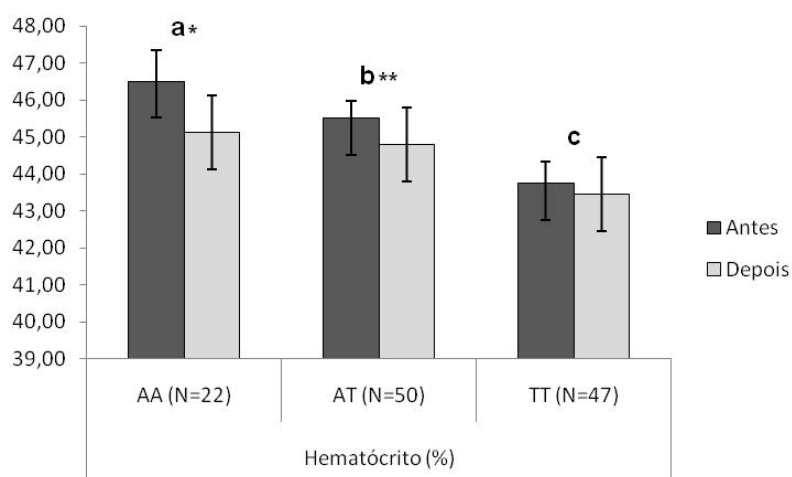


Figura 17 – Influência dos genótipos de CAT na variável hematócrito antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **b** e **c**; **b** = significativo em relação a **c**. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($*p<0,05$) e altamente significativas ($**p<0,001$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

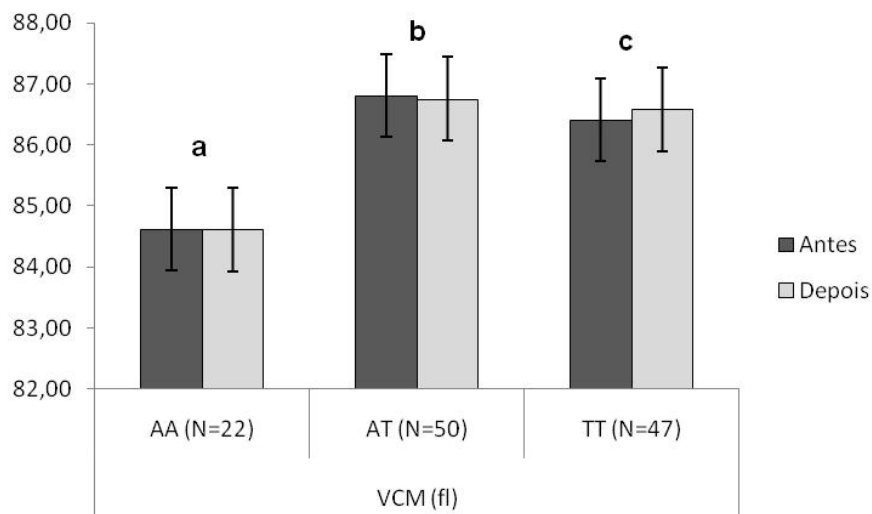


Figura 18 – Influência dos genótipos de CAT na variável VCM antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo a = significativo em relação a **b** e **c**.

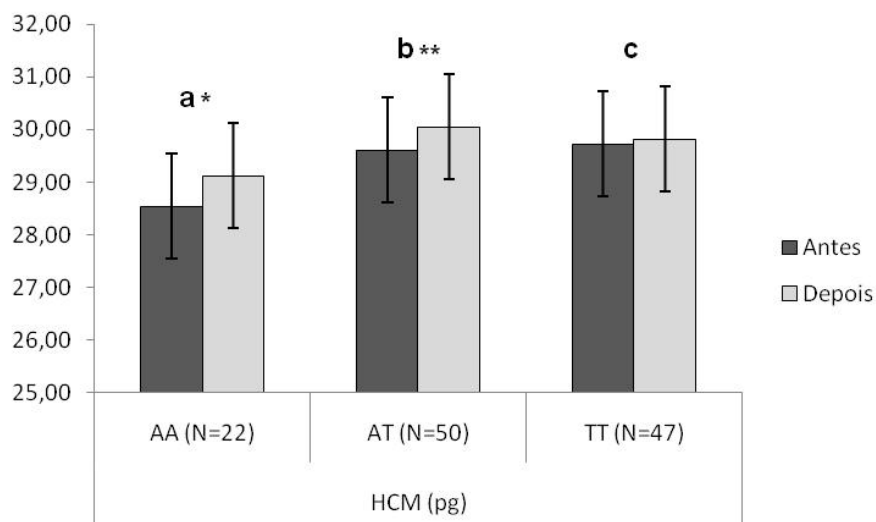


Figura 19 – Influência dos genótipos de CAT na variável HCM antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **b** e **c**. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,05$) e altamente significativas (** $p < 0,001$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

Para GPX1, a análise de variância indicou efeito nulo dos genótipos nos valores das variáveis hemácias, hematócrito, CHCM, RDW, leucócitos totais, linfócitos, segmentados e monócitos; efeito apenas dos genótipos nos valores das variáveis hemoglobina ($p=0,0234$), VCM ($p=0,0230$) e HCM ($p=0,0402$); e efeito tanto do tratamento com pequi ($p=0,0058$) quanto dos genótipos nos valores da variável plaquetas ($p=0,0120$). Para a variável hemoglobina, o teste LSD de Fisher indicou diferenças entre os genótipos 1-1 e 1-2 ($p=0,0341$); para VCM, entre 1-1 e 2-2 ($p=0,0285$) e 1-2 e 2-2 ($p=0,0061$); para HCM, entre 1-1 e 2-2 ($p=0,0134$) e 1-2 e 2-2 ($p=0,0206$); enquanto para plaquetas, não houve diferenças entre os genótipos. As influências dos genótipos GPX1 nas variáveis hemoglobina, VCM e HCM são mostradas nas Figuras 20, 21 e 22. Nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes somente indicou diferenças significativas nos valores de HCM para o genótipo 1-1 ($p=0,0044$) e nos valores de HCM e de plaquetas para o genótipo 1-2 ($p=0,0214$ para HCM e $p=0,0000$ para plaquetas).

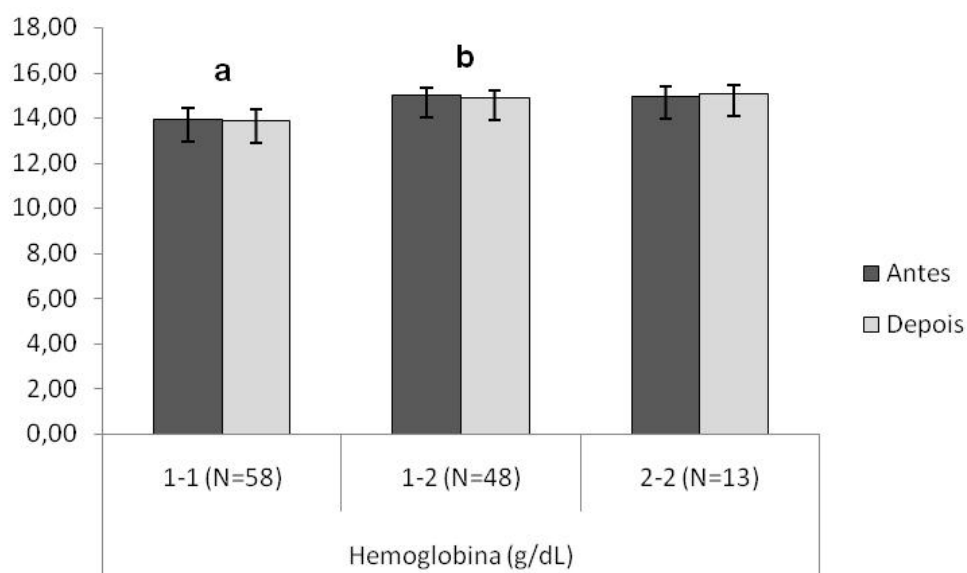


Figura 20 – Influência dos genótipos de GPX1 na variável hemoglobina antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **b**.

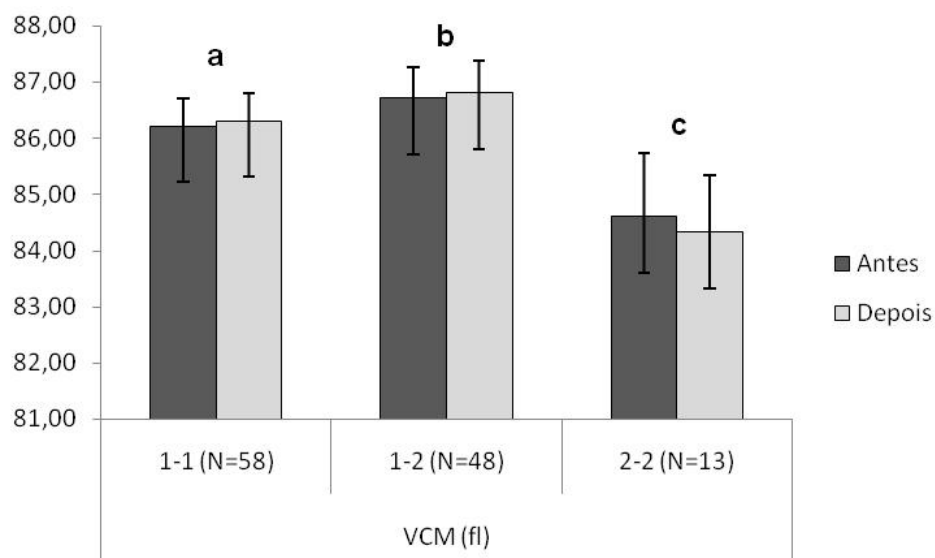


Figura 21 – Influência dos genótipos de GPX1 na variável VCM antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **c**; **b** = significativo em relação a **c**.

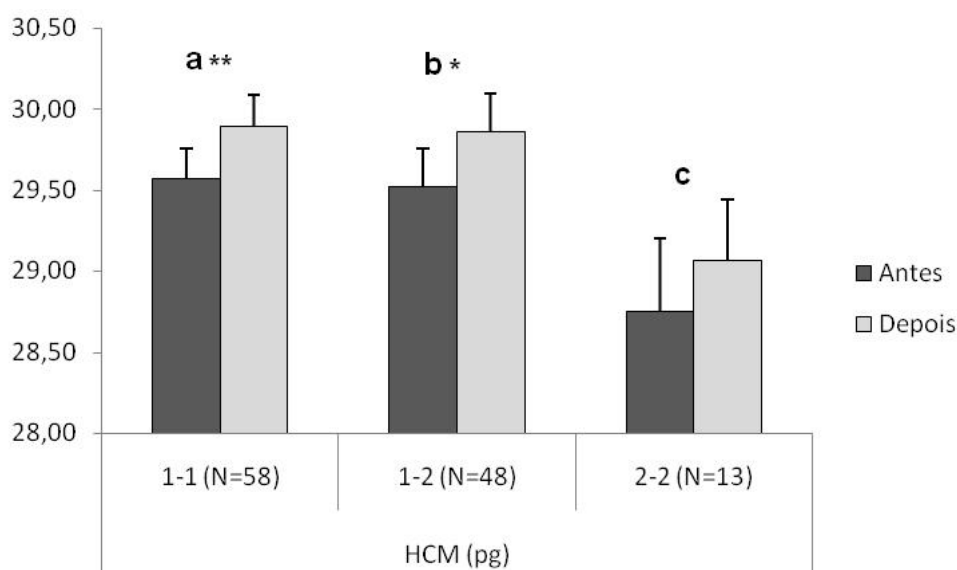


Figura 22 – Influência dos genótipos de GPX1 na variável HCM antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **c**; **b** significativo em relação a **c**. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,05$) e altamente significativas (** $p < 0,001$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

5.3.2.3. Perfil lipídico pós-prandial

As influências da suplementação com óleo de pequi no perfil lipídico pós-prandial (dosagens séricas de colesterol total, triglicerídeos, HDL, LDL e VLDL) são apresentadas na Tabela 45. Após ingestão do óleo de pequi houve uma tendência geral de redução nos valores de colesterol total e LDL, bem como de aumento nos valores de triglicerídeos, HDL e VLDL, tanto para o grupo total quanto para os sexos. Todavia, para o grupo total, não houve nenhuma alteração quantitativa significativa detectada pelo teste T para amostras dependentes.

O modelo de análise de variância usado para verificar a influência da variável sexo mostrou que não houve interação entre os fatores tratamento com as cápsulas de pequi e categorias de sexo (homens e mulheres) para as variáveis analisadas no perfil lipídico. Sendo assim, prosseguiu-se separadamente com as análises. Nos casos em que os efeitos das variáveis consideradas foram diferentes de zero, utilizou-se o teste LSD de Fisher. Para colesterol total, triglicerídeos e VLDL os resultados da análise de variância indicaram que nenhum dos fatores (tratamento com cápsulas de pequi e sexo) teve efeito significativo. Para HDL e LDL, somente o fator sexo mostrou efeito sobre as respostas das variáveis ($p < 0,0001$ para HDL e $p = 0,0409$ para LDL), sendo que nas comparações antes-depois não foram verificadas diferenças significativas nos valores dessas variáveis para nenhum dos sexos.

As influências da suplementação com óleo de pequi nos resultados do perfil lipídico pós-prandial nas diferentes faixas etárias são apresentadas na Tabela 46. Após ingestão das cápsulas de pequi, houve uma tendência geral de redução do colesterol total e de triglicerídeos com o aumento da faixa etária, particularmente a partir de 35–39 anos. Exceto para a faixa etária de 40–44 anos, tendência semelhante ocorreu com o LDL, cujos valores reduziram a partir de 30–34 anos.

Tabela 45 – Influências da suplementação com óleo de pequi nos valores das variáveis do perfil lipídico pós-prandial do grupo total e por sexo.

	Colesterol Total (mg/dL)		Triglicerídeos (mg/dL)		Colesterol HDL (mg/dL)		Colesterol LDL (mg/dL)		Colesterol VLDL (mg/dL)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Total	187,78 ± 3,53	187,29 ± 3,22	113,09 ± 5,58	118,26 ± 4,83	54,25 ± 1,21	54,48 ± 1,26	110,82 ± 2,94	108,70 ± 2,64	22,62 ± 1,12	23,65 ± 0,97
	(N=119)		(N=118)		(N=120)		(N=118)		(N=118)	
Homens	187,23 ± 4,75	186,99 ± 4,29	116,88 ± 6,92	122,99 ± 6,56	49,53 ± 1,19	49,70 ± 1,26	114,08 ± 4,22	112,07 ± 3,67	23,38 ± 1,38	24,60 ± 1,31
	(N=73)		(N=72)		(N=73)		(N=72)		(N=72)	
Mulheres	188,65 ± 5,23	187,76 ± 4,84	107,17 ± 9,38	110,87 ± 6,87	61,57 ± 2,08	61,89 ± 2,17	105,80 ± 3,61	103,50 ± 3,53	21,43 ± 1,88	22,17 ± 1,37
	(N=46)		(N=46)		(N=47)		(N=46)		(N=46)	

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média).

Tabela 46 – Influências da suplementação com óleo de pequi nos valores das variáveis do perfil lipídico pós-prandial por faixa etária (em anos).

Faixa etária	Colesterol Total (mg/dL)		Triglicerídeos (mg/dL)		Colesterol HDL (mg/dL)		Colesterol LDL (mg/dL)		Colesterol VLDL (mg/dL)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
15–19	150,95 ± 6,26 (N=20)	158,00 ± 6,33 (N=20)	88,10 ± 12,77 (N=20)	98,75 ± 11,29 (N=20)	45,60 ± 2,30 (N=20)	48,55 ± 2,29 (N=20)	87,73 ± 4,29 (N=20)	89,70 ± 4,97 (N=20)	17,62 ± 2,56 (N=20)	19,75 ± 2,26 (N=20)
20–24	173,42 ± 6,99 (N=24)	174,75 ± 7,14 (N=24)	97,79 ± 8,52 (N=24)	116,67 ± 11,54* (N=24)	50,00 ± 2,09 (N=24)	50,38 ± 2,13 (N=24)	103,86 ± 6,36 (N=24)	101,04 ± 6,14 (N=24)	19,56 ± 1,70 (N=24)	23,33 ± 2,31* (N=24)
25–29	193,29 ± 6,25 (N=24)	195,33 ± 6,27 (N=24)	117,43 ± 11,63 (N=23)	118,39 ± 9,17 (N=23)	56,08 ± 3,66 (N=24)	56,38 ± 3,69 (N=24)	112,17 ± 7,29 (N=23)	113,76 ± 6,23 (N=23)	23,49 ± 2,33 (N=23)	23,68 ± 1,83 (N=23)
30–34	188,73 ± 8,48 (N=11)	189,00 ± 7,29 (N=11)	119,18 ± 24,56 (N=11)	125,91 ± 19,36 (N=11)	59,27 ± 2,68 (N=11)	59,00 ± 3,12 (N=11)	105,62 ± 8,40 (N=11)	104,82 ± 6,18 (N=11)	23,84 ± 4,91 (N=11)	25,18 ± 3,87 (N=11)
35–39	190,43 ± 6,97 (N=14)	185,07 ± 6,91 (N=14)	137,86 ± 17,59 (N=14)	137,71 ± 9,15 (N=14)	53,40 ± 2,19 (N=15)	50,33 ± 2,70 (N=15)	110,57 ± 6,63 (N=14)	107,39 ± 6,64 (N=14)	27,57 ± 3,52 (N=14)	27,54 ± 1,83 (N=14)
40–44	208,44 ± 9,75 (N=09)	208,44 ± 10,29 (N=09)	121,89 ± 15,26 (N=09)	112,67 ± 14,37 (N=09)	56,00 ± 2,89 (N=09)	56,22 ± 3,41 (N=09)	128,07 ± 8,88 (N=09)	129,69 ± 9,08 (N=09)	24,38 ± 3,05 (N=09)	22,53 ± 2,87 (N=09)
≥45	229,88 ± 8,87 (N=17)	217,59 ± 7,62** (N=17)	129,24 ± 17,83 (N=17)	125,29 ± 16,16 (N=17)	64,41 ± 3,15 (N=17)	64,35 ± 3,81 (N=17)	139,62 ± 6,28 (N=17)	128,18 ± 5,09** (N=17)	25,85 ± 3,57 (N=17)	25,06 ± 3,23 (N=17)

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média). Os asteriscos indicam diferenças significativas (*p<0,05) e altamente significativas (**p<0,01) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

O modelo de análise de variância usado para verificar a influência da faixa etária mostrou que não houve interação entre os fatores tratamento e idade para as variáveis analisadas no perfil lipídico pós-prandial. Sendo assim, prosseguiu-se separadamente com as análises. Nos casos em que os efeitos das variáveis consideradas foram diferentes de zero, utilizou-se o teste LSD de Fisher. Os p-valores obtidos na análise de variância do perfil lipídico pós-prandial indicaram que apenas a faixa etária influenciou nos resultados obtidos com colesterol total ($p<0,0001$), triglicerídeos ($p=0,0395$), HDL ($p<0,0001$), LDL ($p<0,0001$) e VLDL ($p=0,0391$). As diferenças entre as faixas etárias apontadas pelo teste LSD de Fisher são mostradas nas Tabelas 47, 48, 49, 50 e 51. Os p-valores significativos ($p<0,05$) e altamente significativos ($p<0,01$) foram destacados em vermelho e indicaram que, em níveis de significância inferiores a 5%, as variáveis colesterol total, triglicerídeos, HDL, LDL e VLDL apresentaram valores distintos entre as faixas-etárias apresentadas nas tabelas.

Tabela 47 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados do colesterol total nas diferentes faixas etárias.

Faixas etárias	15–19	20–24	25–29	30–34	35–39	40–44	≥ 45 anos
15–19		0,0032	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
20–24	0,0032		0,0014	0,0631	0,0628	<0,0001	<0,0001
25–29	<0,0001	0,0014		0,4918	0,3702	0,0976	<0,0001
30–34	<0,0001	0,0631	0,4918		0,8989	0,0462	<0,0001
35–39	<0,0001	0,0628	0,3702	0,8989		0,0268	<0,0001
40–44	<0,0001	<0,0001	0,0976	0,0462	0,0268		0,0892
≥ 45 anos	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0892	

Os p-valores significativos ($p<0,05$) e altamente significativos ($p<0,01$) foram destacados em vermelho.

Os resultados mostraram que, para colesterol total, a faixa etária de 15–19 anos apresentou diferenças em relação a todas as outras, enquanto a faixa ≥ 45 anos apenas não se diferenciou apenas da idade de 40–44 anos. Nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas apenas para a faixa etária ≥ 45 anos ($p=0,0015$), cujos valores reduziram após suplementação com óleo de pequi.

Tabela 48 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de triglicerídeos nas diferentes faixas etárias (em anos).

Faixas etárias	15–19	20–24	25–29	30–34	35–39	40–44	≥ 45 anos
15–19		0,2532	0,0454	0,0525	0,0016	0,1368	0,0106
20–24	0,2532		0,3586	0,2917	0,0234	0,5190	0,1137
25–29	0,0454	0,3586		0,7512	0,1422	0,9677	0,4634
30–34	0,0525	0,2917	0,7512		0,3430	0,7687	0,7596
35–39	0,0016	0,0234	0,1422	0,3430		0,2291	0,4647
40–44	0,1368	0,5190	0,9677	0,7687	0,2291		0,5434
≥ 45 anos	0,0106	0,1137	0,4634	0,7596	0,4647	0,5434	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

A faixa etária que mais apresentou diferenças em relação às demais para os valores de triglicerídeos foi novamente a de 15–19 anos. Já as faixas de 30–34 e 40–44 anos não apresentaram diferenças em relação às outras, a faixa de 20–24 só apresentou diferenças em relação à de 35–39 e as faixas de 25–29 e ≥45 anos só se diferenciaram da idade de 15–19 anos. Nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas para a faixa etária de 20–24 anos, cujos valores aumentaram após suplementação com óleo de pequi.

Tabela 49 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de HDL nas diferentes faixas etárias (em anos).

Faixas etárias	15–19	20–24	25–29	30–34	35–39	40–44	≥ 45 anos
15–19		0,2531	0,0009	0,0004	0,1193	0,0128	<0,0001
20–24	0,2531		0,0205	0,0066	0,5702	0,0926	<0,0001
25–29	0,0009	0,0205		0,3745	0,1410	0,9732	0,0045
30–34	0,0004	0,0066	0,3745		0,0424	0,4539	0,1322
35–39	0,1193	0,5702	0,1410	0,0424		0,2631	0,0001
40–44	0,0128	0,0926	0,9732	0,4539	0,2631		0,0263
≥ 45 anos	<0,0001	<0,0001	0,0045	0,1322	0,0001	0,0263	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

Em relação ao HDL, a faixa etária que mais se diferenciou foi a ≥ 45 anos, que só não apresentou diferenças em relação à idade de 30–34 anos. Nas comparações antes-depois, nenhuma diferença significativa foi mostrada pelo teste T para amostras dependentes.

Tabela 50 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de LDL nas diferentes faixas etárias (em anos).

Faixas etárias	15–19	20–24	25–29	30–34	35–39	40–44	≥ 45 anos
15–19		0,0187	<0,0001	0,0226	0,0027	<0,0001	<0,0001
20–24	0,0187		0,0539	0,6918	0,3119	0,0005	<0,0001
25–29	<0,0001	0,0539		0,2538	0,5122	0,0382	0,0008
30–34	0,0226	0,6918	0,2538		0,6265	0,0065	0,0001
35–39	0,0027	0,3119	0,5122	0,6265		0,0158	0,0004
40–44	<0,0001	0,0005	0,0382	0,0065	0,0158		0,5254
≥ 45 anos	<0,0001	<0,0001	0,0008	0,0001	0,0004	0,5254	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

As diferenças entre as faixas etárias para LDL foram semelhantes às observadas para colesterol total nas idades de 15–19, 30–34, 35–39 e ≥ 45 anos. Nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas apenas para a faixa etária ≥ 45 anos, cujos valores reduziram após suplementação com óleo de pequi.

Tabela 51 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de VLDL nas diferentes faixas etárias (em anos).

Faixas etárias	15–19	20–24	25–29	30–34	35–39	40–44	≥ 45 anos
15–19		0,2570	0,0276	0,0544	0,0017	0,1400	0,0112
20–24	0,2570		0,2561	0,2956	0,0245	0,5223	0,1166
25–29	0,0276	0,2561		0,8885	0,2030	0,8385	0,5963
30–34	0,0544	0,2956	0,8885		0,3468	0,7705	0,7614
35–39	0,0017	0,0245	0,2030	0,3468		0,2328	0,4683
40–44	0,1400	0,5223	0,8385	0,7705	0,2328		0,5466
≥ 45 anos	0,0112	0,1166	0,5963	0,7614	0,4683	0,5466	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

Os resultados do teste LSD de Fisher para VLDL foram semelhantes aos obtidos para triglicerídeos. Nas comparações antes-depois, nenhuma diferença significativa foi mostrada pelo teste T para amostras dependentes.

As influências da suplementação com óleo de pequi nos resultados do perfil lipídico pós-prandial nas diferentes faixas de distância percorrida são apresentadas na Tabela 52. Como pode ser notado, houve uma tendência de redução do colesterol total e do LDL com o aumento da distância percorrida.

Tabela 52 – Influências da suplementação com óleo de pequi nos valores das variáveis do perfil lipídico pós-prandial por distância percorrida (em Km).

Distância percorrida (Km)	Colesterol Total (mg/dL)		Triglicerídeos (mg/dL)		Colesterol HDL (mg/dL)		Colesterol LDL (mg/dL)		Colesterol VLDL (mg/dL)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
4–5	171,81 ± 5,26 (N=48)	177,44 ± 4,97	107,23 ± 9,39 (N=48)	111,88 ± 7,82	49,63 ± 1,55 (N=49)	51,31 ± 1,69	101,23 ± 4,84 (N=48)	103,44 ± 4,59	21,45 ± 1,88 (N=48)	22,38 ± 1,56
6–7	188,77 ± 5,74 (N=35)	186,77 ± 5,67	106,09 ± 9,87 (N=35)	118,20 ± 9,06	57,06 ± 2,67 (N=35)	55,57 ± 2,57	110,49 ± 4,10 (N=35)	107,56 ± 4,17	21,22 ± 1,97 (N=35)	23,64 ± 1,81
8–10	207,50 ± 7,08 (N=30)	202,03 ± 6,18	130,66 ± 11,07 (N=29)	128,97 ± 9,44	57,77 ± 2,37 (N=30)	58,10 ± 2,69	122,87 ± 6,11 (N=29)	116,57 ± 4,72	26,87 ± 2,26 (N=29)	25,79 ± 1,89
16–21	211,17 ± 10,13 (N=06)	195,33 ± 14,77	116,00 ± 8,96 (N=06)	118,00 ± 16,71	58,00 ± 2,99 (N=06)	55,83 ± 5,38	129,97 ± 10,41 (N=06)	115,90 ± 13,58	23,20 ± 1,79 (N=06)	23,60 ± 3,34

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média).

O modelo de análise de variância usado para verificar a influência da distância percorrida mostrou que não houve interação entre os fatores tratamento e quilômetros percorridos para as variáveis analisadas no perfil lipídico pós-prandial. Sendo assim, prosseguiu-se separadamente com as análises. Nos casos em que os efeitos das variáveis consideradas foram diferentes de zero, utilizou-se o teste LSD de Fisher. Os resultados da análise de variância indicaram que apenas a distância percorrida exerceu influência sobre os valores de colesterol total ($p<0,0001$), HDL ($p=0,0025$) e LDL ($p=0,0027$). Em relação a triglicerídeos e VLDL, nem o tratamento com pequi nem a distância percorrida influenciaram.

As diferenças entre as faixas de distância percorrida apontadas pelo teste LSD de Fisher para colesterol total, HDL e LDL são mostradas nas Tabelas 53, 54 e 55. Os p-valores significativos ($p<0,05$) e altamente significativos ($p<0,01$) foram destacados em vermelho e indicaram que, em níveis de significância inferiores a 5%, as variáveis colesterol total, HDL e LDL apresentaram valores distintos entre as distâncias apresentadas nas tabelas.

Tabela 53 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de colesterol total e as diferentes distâncias percorridas (em Km).

Distância percorrida	4–5	6–7	8–10	16–21
4–5		0,7712	0,0366	0,6679
6–7	0,7712		0,0887	0,7839
8–10	0,0366	0,0887		0,4952
16–21	0,6679	0,7839	0,4952	

Os p-valores significativos ($p<0,05$) e altamente significativos ($p<0,01$) foram destacados em vermelho.

Os resultados indicaram diferença nos valores da variável colesterol total entre 4–5 e 8–10 Km. Nenhuma diferença significativa foi mostrada pelo teste T para amostras dependentes nas comparações antes-depois.

Tabela 54 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de HDL e as diferentes distâncias percorridas (em Km).

Distância percorrida	4–5	6–7	8–10	16–21
4–5		0,0054	0,0007	0,1139
6–7	0,0054		0,4950	0,8847
8–10	0,0007	0,4950		0,8140
16–21	0,1139	0,8847	0,8140	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

Para a variável HDL, os resultados indicaram diferenças entre 4–5 e 6–7 Km e entre 4–5 e 8–10 Km. Nenhuma diferença significativa foi mostrada pelo teste T para amostras dependentes nas comparações antes-depois.

Tabela 55 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados de LDL e as diferentes distâncias percorridas (em Km).

Distância percorrida	4–5	6–7	8–10	16–21
4–5		0,1577	0,0006	0,0242
6–7	0,1577		0,0494	0,1323
8–10	0,0006	0,0494		0,6947
16–21	0,0242	0,1323	0,6947	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

Para LDL, as diferenças só não foram observadas entre 4–5 e 6–7 Km, entre 6–7 e 16–21 Km e entre 8–10 e 16–21 Km. Nenhuma diferença significativa foi mostrada pelo teste T para amostras dependentes nas comparações antes-depois.

O modelo de análise de variância usado para verificar a influência genótipos mostrou que não houve interação entre os fatores tratamento e genótipos para as variáveis analisadas no perfil lipídico. Sendo assim, prosseguiu-se separadamente com as análises. Nos casos em que os efeitos das variáveis consideradas foram diferentes de zero, utilizou-se o teste LSD de Fisher.

Para haptoglobina, a análise de variância indicou efeito nulo dos genótipos nos valores das variáveis colesterol total, triglicerídeos, LDL e VLDL; e efeito apenas dos genótipos nos valores da variável HDL ($p < 0,0001$). Neste caso, o teste LSD de Fisher mostrou diferenças entre

os subtipos Hp1F-1F e Hp1S-1S ($p=0,0045$), Hp1F-1S e Hp1S-1S ($p=0,0342$), Hp1S-1S e Hp1F-2 ($p=0,0485$), Hp1S-1S e Hp1S-2 ($p=0,0045$), Hp1S-1S e Hp2-2 ($p<0,0001$), Hp1F-2 e Hp2-2 ($p=0,0038$) e Hp1S-2 e Hp2-2 ($p=0,0102$). Nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas apenas para Hp1F-1F ($p=0,0325$), cujos valores aumentaram após suplementação com óleo de pequi. Quando os subtipos de Hp^{*1} foram agrupados (tipos de Hp), o teste LSD de Fisher indicou diferenças entre Hp1-1 e Hp2-2 ($p=0,0003$) e entre Hp2-1 e Hp2-2 ($p=0,0056$), porém nenhuma diferença significativa foi mostrada pelo teste T para amostras dependentes nas comparações antes-depois. As influências dos subtipos e dos tipos de Hp na variável HDL são apresentadas nas Figuras 23 e 24.

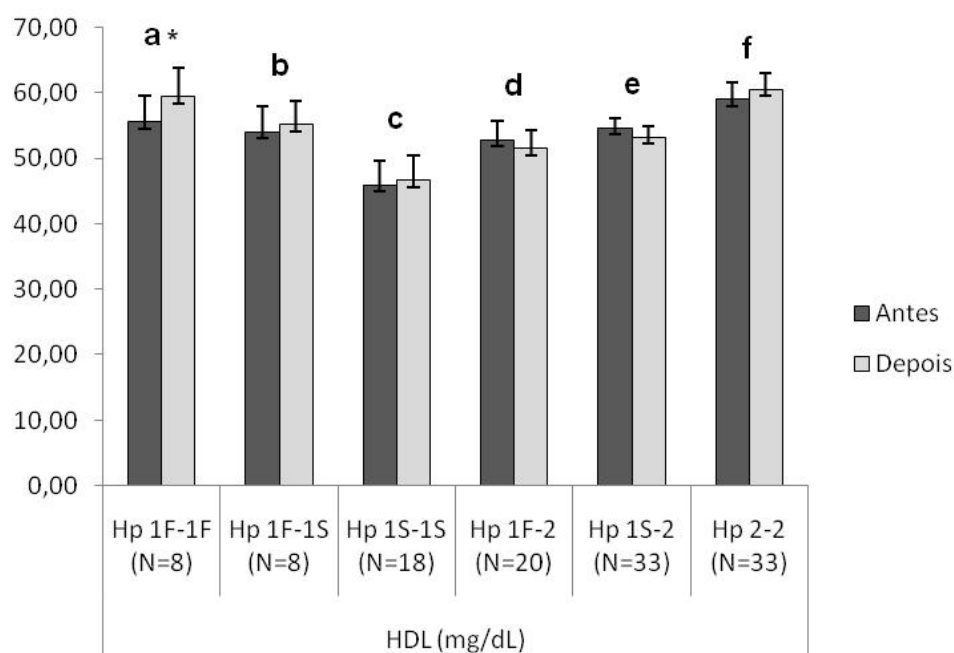


Figura 23 – Influência dos subtipos de Hp na variável HDL antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **c**; **b** significativo em relação a **c**; **c** = significativo em relação a **d**, **e** e **f**; **d** = significativo em relação a **f**; **e** = significativo em relação a **f**. O asterisco indica diferença significativa ($*p<0,05$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

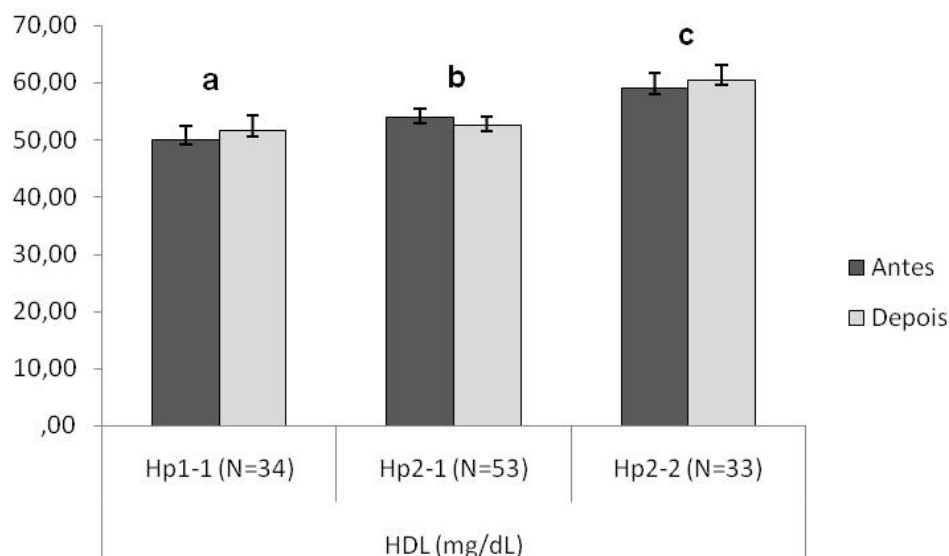


Figura 24 – Influência dos tipos de Hp na variável HDL antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo a = significativo em relação a c; b = significativo em relação a c.

Para Mn-SOD e GPX1, a análise de variância indicou efeito nulo dos genótipos nos valores de todas as variáveis analisadas no perfil lipídico.

Para CAT, a análise de variância indicou efeito nulo dos genótipos nos valores de colesterol total, triglicerídeos, LDL e VLDL e efeito apenas dos genótipos nos valores de HDL ($p=0,0098$). O teste LSD de Fisher indicou diferenças entre os genótipos AA e AT ($p=0,0033$) e AA e TT ($p=0,0096$), porém nenhuma diferença significativa foi mostrada pelo teste T para amostras dependentes nas comparações antes-depois. A influência dos genótipos CAT na variável HDL é mostrada na Figura 25.

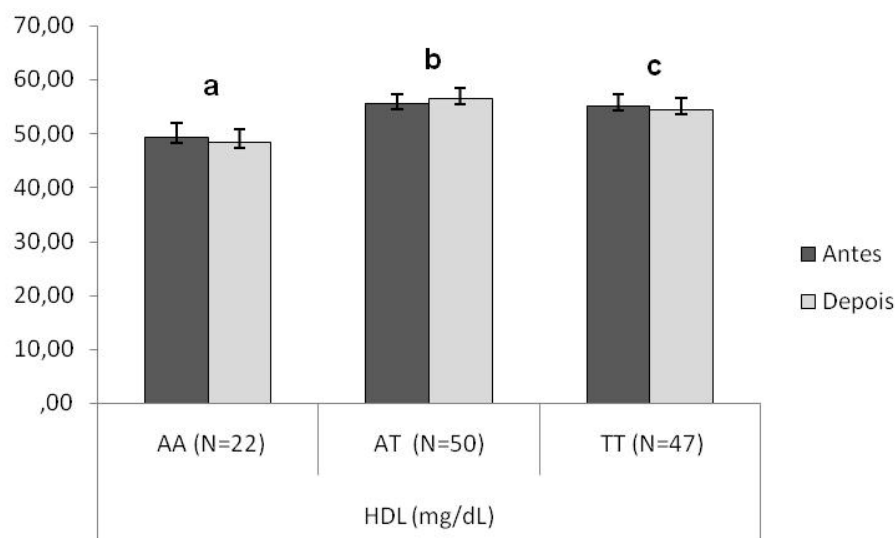


Figura 25 – Influência dos genótipos CAT na variável HDL antes e depois da suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **b** e **c**.

5.3.2.4. Teste de TBARS

A influência da suplementação com óleo de pequi na peroxidação lipídica do plasma, avaliada pela concentração média (em nmol/mL) de malonaldeído (MDA) e verificada pelo teste de TBARS, é apresentada na Figura 26. Após ingestão das cápsulas de pequi foi observada redução na média dos valores de MDA tanto para o grupo total quanto para o sexo masculino. Apesar do sexo feminino não ter apresentado alteração nas comparações antes-depois, houve uma tendência geral de redução do erro padrão da média (tendência de redução da variabilidade) tanto para grupo total quanto para os sexos, após suplementação com óleo de pequi. Para o grupo total, o teste T para amostras dependentes não apresentou diferença significativa na comparação antes-depois.

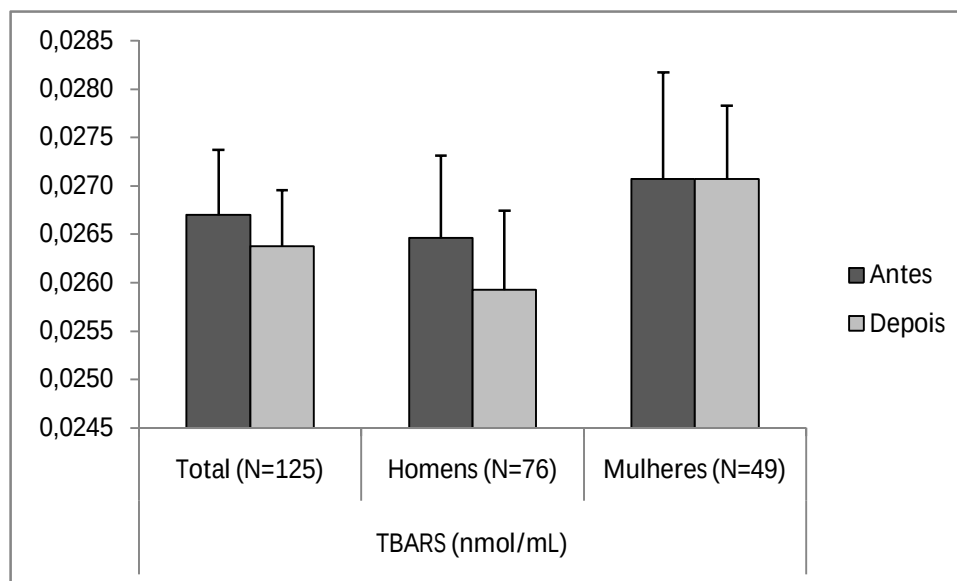


Figura 26 – Resultados do teste de TBARS para o grupo total e por sexo antes e após a suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média).

O modelo de análise de variância usado para verificar as influências de sexo, faixa etária, distância percorrida e genótipos mostrou que não houve interação entre essas variáveis e o tratamento com as cápsulas de pequi nas análises de TBARS. Sendo assim, prosseguiu-se separadamente com cada análise. Nos casos em que os efeitos das variáveis consideradas foram diferentes de zero, utilizou-se o teste LSD de Fisher.

Os resultados indicaram que nem o tratamento com o pequi nem o sexo exerceram influência estatisticamente significativa nos valores de TBARS.

A análise de variância indicou que os resultados do teste de TBARS foram influenciados por idade ($p=0,0087$), distância percorrida ($p=0,0007$) e genótipos de haptoglobina ($p=0,0008$) e de Mn-SOD ($p=0,0072$), não havendo influência estatisticamente significativa do tratamento com as cápsulas de pequi.

As diferenças entre as faixas etárias detectadas pelo teste LSD de Fisher são mostradas na figura 27 e apresentadas na Tabela 56. Os p -valores significativos ($p<0,05$) e altamente significativos ($p<0,01$) foram destacados em vermelho e indicaram que, em níveis de significância inferiores a 5%, o teste de TBARS apresentou valores distintos entre as faixas de distância percorrida indicadas na tabela.

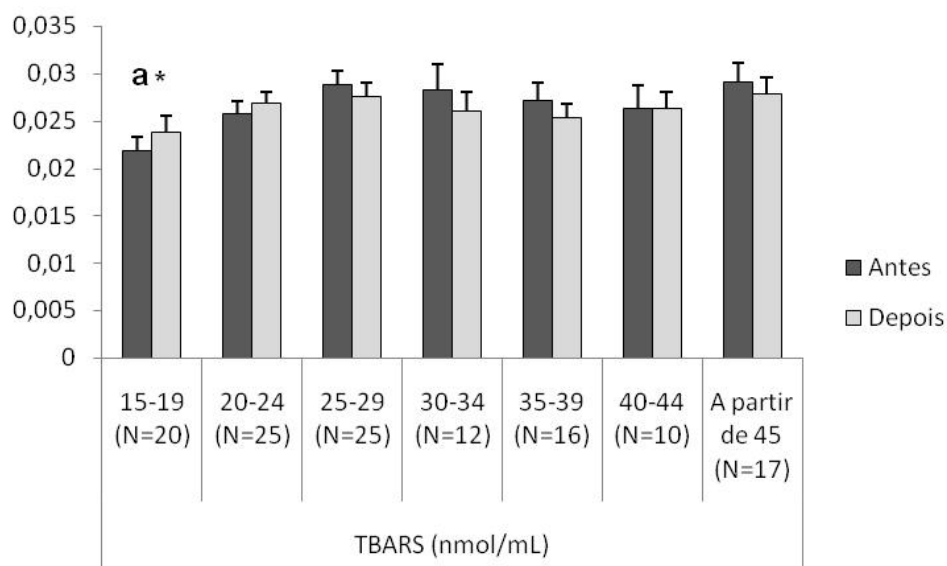


Figura 27 – Resultados do teste de TBARS por faixa etária antes e após suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). A letra a indica que a faixa etária de 15–19 anos se diferenciou das demais pelo teste LSD de Fisher. O asterisco indica diferença significativa ($*p < 0,05$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

Tabela 56 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados do teste de TBARS e as diferentes faixas etárias (em anos).

Faixas etárias	15–19	20–24	25–29	30–34	35–39	40–44	≥ 45 anos
15–19		0,0176	0,0003	0,0143	0,0362	0,0687	0,0005
20–24	0,0176		0,1783	0,6001	0,9740	0,9813	0,1498
25–29	0,0003	0,1783		0,5745	0,2217	0,2976	0,8179
30–34	0,0143	0,6001	0,5745		0,6104	0,6523	0,4748
35–39	0,0362	0,9740	0,2217	0,6104		0,9967	0,1834
40–44	0,0687	0,9813	0,2976	0,6523	0,9967		0,2464
≥ 45 anos	0,0005	0,1498	0,8179	0,4748	0,1834	0,2464	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

Os resultados indicaram que a faixa etária de 15–19 anos se diferenciou das demais. Nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas para esta faixa etária, cujos valores aumentaram após suplementação com óleo de pequi.

As diferenças entre as faixas de distância percorrida detectadas pelo teste LSD de Fisher são mostradas na Figura 28 e apresentadas na Tabela 57. Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho e indicaram que, em níveis de

significância inferiores a 5%, o teste de TBARS apresentou valores distintos entre as faixas de distância percorrida indicadas na tabela.

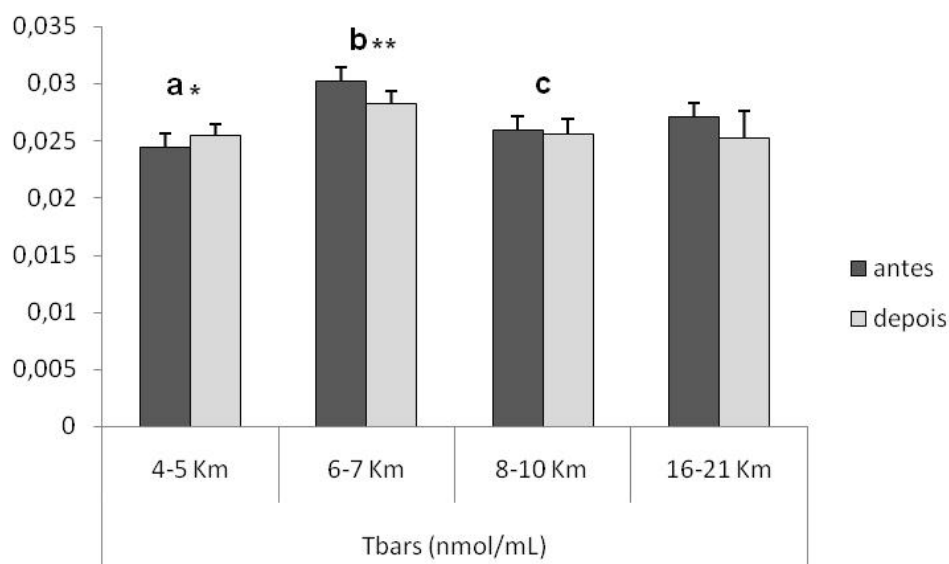


Figura 28 – Resultados do teste de TBARS por distância percorrida antes e após suplementação com óleo de pequi.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **b**; **b** = significativo em relação a **c**. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,05$) e altamente significativas (** $p < 0,01$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

Tabela 57 – P-valores obtidos no teste LSD de Fisher para comparações entre os resultados do teste de TBARS e as diferentes faixas de distância percorrida (em Km).

Distância percorrida	4–5	6–7	8–10	16–21
4–5		<0,0001	0,4822	0,5463
6–7	<0,0001		0,0039	0,1269
8–10	0,4822	0,0039		0,8466
16–21	0,5463	0,1269	0,8466	

Os p-valores significativos ($p < 0,05$) e altamente significativos ($p < 0,01$) foram destacados em vermelho.

Nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas para as distâncias de 4–5 Km ($p = 0,0427$), cujos valores aumentaram após suplementação com óleo de pequi, e 6–7 Km ($p = 0,0034$), cujos valores reduziram após suplementação.

Para os genótipos de haptoglobina, o teste LSD de Fisher mostrou diferenças nos valores do teste de TBARS entre os subtipos Hp 1F-1F e 1S-1S ($p=0,0101$), 1F-1F e 2-2 ($p=0,0153$), 1F-1S e 1S-1S ($p=0,0004$), 1F-1S e 1F-2 ($p=0,0340$), 1F-1S e 1S-2 ($p=0,0385$), 1F-1S e 2-2 ($p=0,0006$), 1S-1S e 1S-2 ($p=0,0156$) e 1S-1S e 2-2 ($p=0,0213$). Nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas para os genótipos Hp1S-1S ($p=0,0088$), cujos valores aumentaram após suplementação com óleo de pequi, e Hp1S-2 ($p=0,0013$), cujos valores diminuíram após suplementação. A influência dos subtipos de Hp nos resultados do teste de TBARS é mostrada na Figura 29.

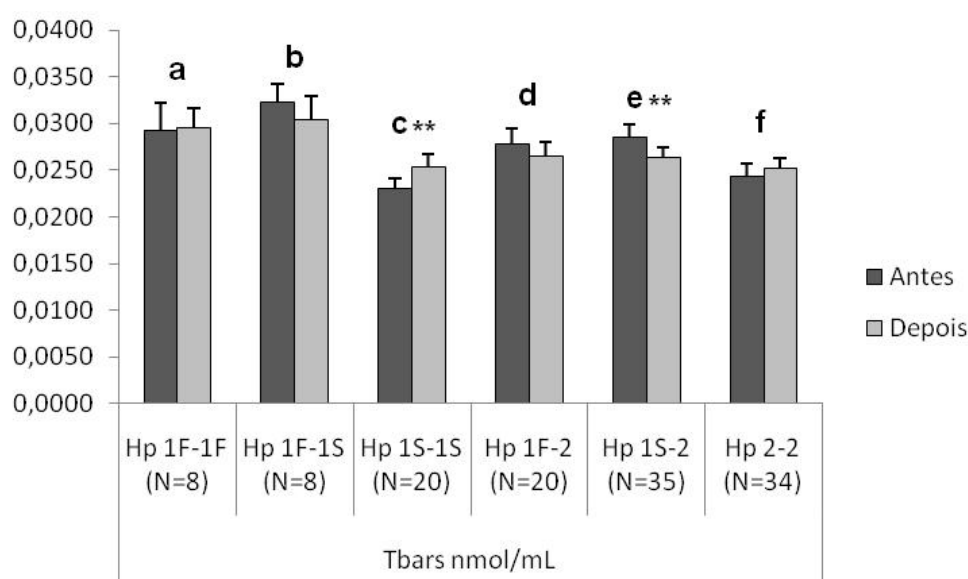


Figura 29 – Influência dos subtipos de Hp nos resultados do teste de TBARS.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **c** e **f**; **b** = significativo em relação a **c**, **d**, **e** e **f**; **c** = significativo em relação a **e** e **f**. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p<0,05$) e altamente significativas (** $p<0,01$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

Quando os alelos Hp^{*1} foram considerados conjuntamente (tipos de Hp), os resultados indicaram que somente para níveis de significância superiores a 5,2%, o genótipo Hp exerceu influência sobre os valores do teste de TBARS. Neste caso, as diferenças detectadas pelo teste LSD de Fisher ocorreram entre Hp2-1 e Hp2-2 ($p=0,0185$). Nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes mostrou diferenças significativas apenas para Hp2-1 ($p=0,0004$), cujos valores diminuíram após suplementação com óleo de pequi. A influência dos tipos de Hp nos resultados do teste de TBARS é mostrada na Figura 30.

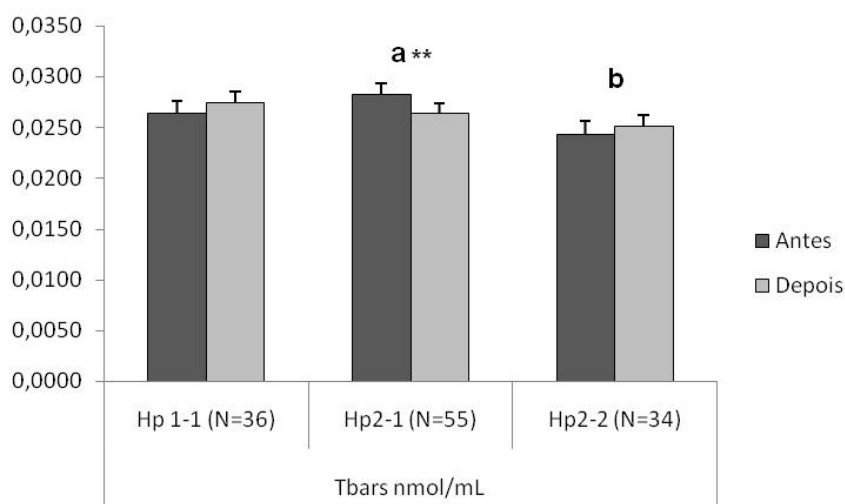


Figura 30 – Influência dos tipos de Hp nos resultados do teste de TBARS.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **b**. Os asteriscos indicam diferenças altamente significativas (** $p < 0,01$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

Para os genótipos de Mn-SOD, o teste LSD de Fisher detectou diferenças nos valores do teste de TBARS entre 1-1 e 1-2 ($p = 0,0032$). Nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas apenas para o genótipo 1-1 ($p = 0,0047$), cujos valores diminuíram após suplementação com óleo de pequi. A influência dos genótipos Mn-SOD nos resultados do teste de TBARS é mostrada na Figura 31.

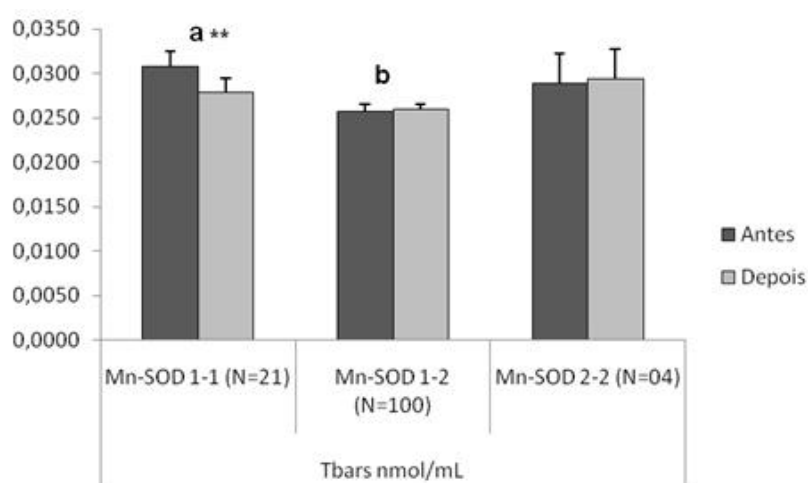


Figura 31 – Influência dos genótipos Mn-SOD nos resultados do teste de TBARS.

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). As letras indicam diferenças significativas entre os genótipos pelo teste LSD de Fisher, sendo **a** = significativo em relação a **b**. Os asteriscos indicam diferenças altamente significativas (** $p < 0,01$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

5.3.2.5. Pressão arterial e PCR ultra-sensível

As influências da suplementação com óleo de pequi na pressão arterial (sistólica e diastólica) e nos valores da proteína-C reativa ultra-sensível (PCR-US) são apresentadas na Tabela 58. Após ingestão do óleo de pequi houve uma tendência geral de redução da pressão arterial (sistólica e diastólica, tanto para o grupo total quanto para os sexos. Tendência semelhante ocorreu com os valores de PCR-US, exceto para o sexo feminino. Os resultados do teste T para amostras dependentes foram significativos para a redução da pressão arterial ($p=0,001$ para pressões sistólica e diastólica).

Tabela 58 – Influências da suplementação com óleo de pequi na pressão arterial e nos valores da PCR-US do grupo total e por sexo.

	Pressão sistólica (mmHg)		Pressão diastólica (mmHg)		PCR-US (mg/dL)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Total	115,21 ± 0,70 (N=117)**	112,14 ± 0,76	72,65 ± 0,82 (N=117)**	68,97 ± 0,73	1,59 ± 0,21 (N=114)	1,55 ± 0,17
Homens	117,22 ± 0,87 (N=72)**	114,31 ± 0,90	74,72 ± 1,06 (N=72)**	70,83 ± 0,92	1,98 ± 0,33 (N=67)	1,61 ± 0,22
Mulheres	112,00 ± 1,03 (N=45)*	108,67 ± 1,17	69,33 ± 1,12 (N=45)*	66,00 ± 1,07	1,05 ± 0,16 (N=47)	1,47 ± 0,26

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média). Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p<0,05$) e altamente significativas (** $p<0,01$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

O modelo de análise de variância usado para verificar as influências de sexo, faixa etária, distância percorrida e genótipos mostrou que não houve interação entre essas variáveis e o tratamento com as cápsulas de pequi nas análises de pressão arterial e PCR-US. Sendo assim, prosseguiu-se separadamente com as análises. Nos casos em que os efeitos das variáveis consideradas foram diferentes de zero, utilizou-se o teste LSD de Fisher.

Para PCR-US os resultados da análise de variância mostraram que o fator sexo exerceu efeito significativo ($p=0,0491$), enquanto para pressão arterial, ambos os fatores (tratamento com pequi e sexo) influenciaram (Tabela 59). Nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas para as pressões sistólica ($p=0,0072$ para homens e $p=0,0305$ para mulheres) e diastólica ($p=0,0029$ para homens e $p=0,0305$ para mulheres), cujos valores diminuíram após tratamento com óleo de pequi. Nenhuma diferença significativa foi mostrada pelo teste T para amostras dependentes para a PCR-US nas comparações antes-depois.

Tabela 59 – P-valores obtidos na análise de variância para a influência dos fatores tratamento com cápsulas de pequi e sexo nos valores da pressão arterial.

	Pressão sistólica	Pressão diastólica
Tratamento com cápsulas de pequi	0,0024	0,0015
Sexo	<0,0001	<0,0001

As influências da suplementação com óleo de pequi nos resultados da pressão arterial e da PCR-US nas diferentes faixas etárias são apresentadas na Tabela 60. Após ingestão das cápsulas de pequi, houve uma tendência geral de queda na pressão arterial em todas as faixas etárias, exceto para a pressão sistólica na faixa de 30–34 anos. Já para os valores de PCR-US, houve aumento em quatro faixas etárias e redução em três.

Tabela 60 – Influências da suplementação com óleo de pequi nos resultados da pressão arterial e da PCR-US por faixa etária.

Faixa etária (anos)	Pressão sistólica (mmHg)		Pressão diastólica (mmHg)		PCR-US (mg/dL)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
15–19	114,50 ± 1,35	111,00 ± 1,43	71,50 ± 1,50	69,00 ± 1,61	1,35 ± 0,57	1,66 ± 0,58
	(N=20)		(N=20)		(N=19)	
	115,83 ± 1,69	113,75 ± 2,15	72,08 ± 1,90	69,58 ± 1,75	1,96 ± 0,69	2,39 ± 0,51
20–24	(N=24)		(N=24)		(N=20)	
	116,36 ± 1,40	113,64 ± 1,55	75,00 ± 2,05	71,82 ± 1,69	1,83 ± 0,42	1,76 ± 0,36
	(N=22)		(N=22)		(N=22)	
25–29	112,73 ± 2,37	114,55 ± 2,47	70,00 ± 3,30	67,27 ± 2,73	1,64 ± 0,48	0,69 ± 0,12
	(N=11)		(N=11)		(N=12)	
	113,33 ± 2,11	109,33 ± 2,28	74,67 ± 2,36	68,00 ± 2,23	1,92 ± 0,75	1,46 ± 0,45
30–34	(N=15)		(N=15)		(N=14)	
	116,00 ± 3,39	112,00 ± 2,49	72,00 ± 2,91	70,00 ± 2,11	0,74 ± 0,26	0,79 ± 0,25
	(N=10)		(N=10)		(N=10)	
35–39	116,67 ± 1,87	110,00 ± 1,69	72,00 ± 2,00	65,33 ± 1,65	1,28 ± 0,29	1,30 ± 0,25
	(N=15)**		(N=15)**		(N=16)	

Os dados são expressos como média ± EP (erro padrão da média). Os asteriscos indicam diferenças altamente significativas (**p<0,01) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

Os resultados da análise de variância indicaram que apenas o tratamento com pequi exerceu influência nos valores da pressão arterial ($p=0,0080$ para pressão sistólica e $p=0,0026$ para pressão diastólica), enquanto nenhum dos fatores exerceu influência significativa na variável PCR-US. Nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas na pressão arterial apenas para a faixa etária ≥ 45 anos ($p=0,0031$ para as pressões sistólica e diastólica), cujos valores diminuíram após tratamento com óleo de pequi. Para PCR-US, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças na faixa etária de 30–34 anos em níveis de significância superiores a 8,76%.

As influências da suplementação com óleo de pequi nos resultados da pressão arterial e da PCR-US nas diferentes faixas de distância percorrida são apresentadas na Tabela 61. Novamente, após a suplementação com pequi houve uma tendência de queda da pressão arterial em todas as faixas de distância percorrida, exceto para a pressão diastólica na faixa de 6–7 Km.

Tabela 61 – Influências da suplementação com óleo de pequi nos resultados da pressão arterial e da PCR-US por distância percorrida.

Faixa etária (anos)	Pressão sistólica (mmHg)		Pressão diastólica (mmHg)		PCR-US (mg/dL)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
4–5	114,79 $\pm$ 1,11 (N=48)	112,71 $\pm$ 1,25	72,08 $\pm$ 1,15 (N=48)**	68,13 $\pm$ 1,14	1,29 $\pm$ 0,35 (N=44)	1,53 $\pm$ 0,33
6–7	114,41 $\pm$ 1,28 (N=34)	111,18 $\pm$ 1,32	69,12 $\pm$ 1,66 (N=34)	69,71 $\pm$ 1,30	1,85 $\pm$ 0,32 (N=35)	1,54 $\pm$ 0,24
8–10	116,43 $\pm$ 1,47 (N=28)	112,50 $\pm$ 1,68	76,79 $\pm$ 1,55 (N=28)**	69,29 $\pm$ 1,62	1,72 $\pm$ 0,46 (N=29)	1,72 $\pm$ 0,33
16–21	117,14 $\pm$ 2,86 (N=07)	111,43 $\pm$ 1,43	77,14 $\pm$ 1,84 (N=07)*	70,00 $\pm$ 3,09	1,51 $\pm$ 0,74 (N=06)	0,99 $\pm$ 0,25

Os dados são expressos como média $\pm$ EP (erro padrão da média). Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p<0,05$) e altamente significativas (** $p<0,01$) na comparação antes-depois pelo Teste T para amostras dependentes.

A análise de variância indicou que apenas o tratamento com pequi influenciou nos valores da pressão arterial ($p=0,0070$ para pressão sistólica e $p=0,0023$ para pressão diastólica), enquanto nenhum dos fatores exerceu influência significativa na variável PCR-US. Nas comparações antes-depois, o teste T para amostras dependentes indicou diferenças significativas na pressão diastólica para as distâncias de 4–5 ($p=0,0076$), 8–10 ($p=0,0002$) e 16–21 Km (0,0465), cujos valores diminuíram após tratamento com óleo de pequi.

Os resultados também indicaram efeito nulo dos genótipos estudados (Hp, Mn-SOD, CAT e GPX1) tanto para os valores da pressão arterial quanto para os valores da PCR-US, e efeito

apenas do tratamento com as cápsulas de pequi para os valores da pressão arterial (sistólica e diastólica). Sendo assim, as conclusões foram as mesmas obtidas quando não se levou em consideração os genótipos.

5.3.2.6. Efeitos Colaterais

Nenhum atleta se retirou do estudo por causa de desconforto ou efeitos adversos associados ao tratamento. Onze indivíduos sentiram sonolência pesada, enquanto quatro relataram insônia; seis voluntários tiveram um leve desconforto intestinal, dois relataram constipação intestinal, três informaram flatulência aumentada, um homem queixou-se de azia, duas mulheres informaram acne aumentada e uma mulher descreveu o aparecimento de nódulos subcutâneos dolorosos nos braços. Todos os sintomas foram notados nos primeiros 3-4 dias de tratamento, desaparecendo logo depois.

5.3.2.7. Aceitação das cápsulas

De maneira geral as cápsulas foram bem aceitas. Apenas os voluntários que não seguiram a recomendação de ingestão após o almoço e/ou jantar e ingeriram as cápsulas em jejum relataram aumento de eructação. No entanto, foi unânime a reclamação do grande tamanho das cápsulas e, neste caso, desconforto na hora da ingestão.

6. DISCUSSÃO

O pequi é um fruto encontrado em regiões onde as árvores recebem alta incidência de raios solares, o que favorece a geração de RL. Adicionalmente, tanto a polpa quanto a amêndoa são ricas em lipídios, os quais, sob ação de ERO, estão sujeitos à lipoperoxidação. Essas condições favorecem a biossíntese de compostos secundários com propriedades antioxidantes, tais como compostos fenólicos e carotenóides (Lima *et al.*, 2007) e também de compostos primários como a vitamina C, conhecida por ser um antioxidante que auxilia as plantas a lidar com estresses provocados por seca, temperatura, salinidade, ozônio e radiação UV (Lee e Kader, 2000; Smirnoff, 2003; Foyer e Noctor, 2005). A literatura apresenta teores elevados de vitamina C e de carotenóides totais para a polpa do pequi (Ramos *et al.*, 2001; Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, 2004; Santos *et al.*, 2005; Boletim informativo UFMG nº 1511, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2007), presentes respectivamente, no extrato aquoso (EAP) e no extrato orgânico (EOP ou óleo de pequi) utilizados nos estudos *in vivo* deste trabalho.

6.1. Testes pré-clínicos e toxicológicos em camundongos

O teste do micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos, enquanto o teste do cometa é usado em estudos genotóxicos para avaliar danos no DNA de células eucarióticas individuais (Schmid, 1975; Natarajan e Obe, 1982; Henderson *et al.*, 1998; FDA, 2000; Ribeiro, 2003). No presente estudo, ambos os testes mostraram que o EOP a 0,5 mL kg⁻¹ ou a 1 mL kg⁻¹ não teve efeito clastogênico nem genotóxico nas células da medula óssea ou de linfócitos do sangue periférico de camundongos, corroborando os resultados reportados por Khouri *et al.* (2007).

O sulfato de bleomicina (BLM) é um glicopeptídeo radiomimético usado rotineiramente na quimioterapia do câncer; produz MN em células humanas, de ratos e de camundongos, principalmente através de danos oxidativos no DNA (Erexson *et al.*, 1995). A degradação do DNA mediada por BLM exige a presença do oxigênio molecular e de um íon metálico como Fe²⁺ ou Cu²⁺ para produzir ERO, que são tóxicas e mutagênicas para uma variedade de modelos biológicos *in vitro* e *in vivo* (Hoffmann *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1995; Erexson *et al.*, 1995; Hecht, 2000).

Nossos resultados confirmaram os efeitos citotóxicos e genotóxicos de BLM e igualmente demonstraram que a administração prévia de EOP a 1 mL kg⁻¹ protegeu claramente as células da medula óssea de camundongos contra a lise induzida por BLM a 50 mg kg⁻¹. Embora o EOP a 0,5 mL kg⁻¹ não tenha protegido contra a indução de MN-EPC por BLM 25 mg kg⁻¹, favoreceu a redução de MN-ENC (comparação dos grupos M7 e M10). Na concentração de 0,5 mL kg⁻¹, o

EOP também favoreceu a redução de MN-EPC induzidos por BLM a 10 mg kg⁻¹ (comparação dos grupos M11 e M12), apesar de estatisticamente não significativa. O aumento do índice de proliferação celular observado em M12 confirmou que o EOP, em todas as concentrações usadas, protegeu de alguma forma as células da medula dos camundongos contra a clastogenicidade da BLM. Adicionalmente, nossos resultados sugeriram que o EOP também forneceu proteção contra os efeitos clastogênicos naturais (comparação de M1 com M3 e M8), apesar da redução de MN-ENC não ter sido estatisticamente significativa. Resultados semelhantes de proteção foram obtidos no teste do cometa. Enquanto o EAP a 1 mL kg⁻¹ forneceu proteção significativa contra danos no DNA induzidos por BLM a 25 mg kg⁻¹, EOP 0.5 mL kg⁻¹ igualmente contribuiu com a redução de danos (C5 contra C6), apesar deste resultado não ter sido estatisticamente significativo.

Uma vez que a citotoxicidade de BLM envolve a produção de ERO (Hoffmann *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1995; Erexson *et al.*, 1995; Hecht, 2000), nossos resultados sugerem que a proteção do DNA contra danos oxidativos induzidos por BLM foi mediada por componentes antioxidantes presentes nos extratos do pequi. De fato, estudos prévios têm indicado que compostos com atividade antioxidante podem modular a genotoxicidade induzida por BLM (Povirk e Austin, 1991; Povirk, 1996; Khouri *et al.*, 2007). Os resultados do teste do cometa confirmaram os resultados do teste do micronúcleo (MN) e mostraram que a habilidade dos dois extratos em proteger o DNA contra danos oxidativos induzidos por BLM foi limitada à concentração do extrato. Nas concentrações usadas, a maior proteção observada com EAP provavelmente refletiu seu conteúdo mais alto em antioxidantes.

A ciclofosfamida (CP) é um composto organofosforado do tipo mostarda nitrogenada largamente usado como agente antineoplásico. É um agente alquilante não-específico que interage quimicamente com o DNA. É um pró-fármaco, ou seja, necessita ser metabolizado no fígado por enzimas fosfamidases (oxidases) para que seus metabólitos possam exercer o efeito alquilante celular (Almeida *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2007a). A fosforamida mostarda, metabólito de CP responsável por seu efeito antineoplásico, é um agente alquilante que induz uma variedade de alterações no DNA (IARC, 1981; Krishna *et al.*, 1987; Santos *et al.*, 2007a), sendo capaz de formar ligações cruzadas interfilamentares e modificar o DNA covalentemente (Anderson *et al.*, 1995; Almeida *et al.*, 2005).

Compostos com propriedades antioxidantes, tais como vitamina C (presente no EAP) e β -caroteno (presente no EOP) podem ter efeito antioxidante ou pró-oxidante, dependendo da dose (Antunes e Takahashi, 1999; Paolini *et al.*, 2003). Esses dois lados ou efeito Janus refletem a natureza dual de certas substâncias químicas, tais como antioxidantes e fármacos usados no tratamento do câncer. Nosso estudo mostrou que o EOP apresentou tal efeito: a 0.5 mL kg⁻¹ protegeu as células contra a genotoxicidade (teste do cometa) e a clastogenicidade (teste de MN) de CP; no entanto, a 1 mL kg⁻¹ favoreceu o aumento da frequência de MN na presença de CP a

30 mg kg⁻¹. Resultados similares foram reportados por Khouri *et al.* (2007), quando usaram tratamento combinado de EAP a 1 mL kg⁻¹ com CP a 33 mg kg⁻¹ ou 66 mg kg⁻¹.

Muitos estudos indicam que o consumo regular de frutas e vegetais ricos em nutrientes antioxidantes pode reduzir o risco de câncer (Saeed *et al.*, 2005); outros indicam que alguns nutrientes antioxidantes como β - caroteno e vitaminas C e E minimizam os efeitos tóxicos produzidos por quimioterápicos e interferem positivamente na resposta ao tratamento empregado (Santos e Cruz, 2001; Borek, 2004). De acordo com Liu *et al.* (2003) e Berger (2005), a suplementação antioxidante na dieta pode reduzir o nível de danos oxidativos no DNA e proteger as células contra os efeitos colaterais adversos de alguns agentes quimioterápicos. Adicionalmente, tem sido demonstrado que antioxidantes, quando administrados conjuntamente com antineoplásicos, potencializam o efeito desses fármacos, resultando em diminuição do tamanho do tumor com produção de menos efeitos colaterais, melhoria da qualidade de vida e maior tempo de sobrevida dos pacientes oncológicos (Santos e Cruz, 2001).

Nossos resultados estão alinhados com muitos outros, demonstrando que ingredientes com propriedades antioxidantes presentes em extratos de plantas podem proteger o DNA contra danos causados por ERO (Owen *et al.*, 2003; Cano *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Khouri *et al.* 2007). Apesar de o presente trabalho ter usado camundongos saudáveis e nenhum estudo experimental ter sido realizado em células cancerosas, pelo exposto acima e mediante nossos resultados, podemos sugerir que tanto o EOP quanto o EAP, através de suas propriedades antioxidantes, protegeram o DNA contra danos oxidativos causados por BLM e CP e que este efeito modulatório foi relacionado à concentração do extrato usado.

O ataque oxidativo a componentes celulares é um mecanismo relevante na patogênese de diversas doenças humanas tais como aterosclerose, doenças cardiovasculares, diabetes, desordens hepáticas e doenças inflamatórias reumáticas (Wasowicz *et al.*, 1993; Jentzsch *et al.*, 1996). ERO agredem os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídeos de membranas celulares, causando alteração na estrutura e permeabilidade das mesmas e levando à formação de produtos tóxicos, entre eles o malonaldeído (MDA) (Janero, 1990; Wasowicz *et al.*, 1993). O teste de TBARS é um método simples e sensível para quantificar MDA (Janero, 1990; Wasowicz *et al.*, 1993) e, conseqüentemente, avaliar o índice de peroxidação lipídica e o estresse oxidativo (Jentzsch *et al.*, 1996). Baseia-se no fato de que, em condições de baixo pH e altas temperaturas, o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), originando um aduto MDA-TBA que pode ser quantificado por espectrofotometria, fluorimetria ou cromatografia líquida de alta performance (Janero, 1990; Wasowicz *et al.*, 1993).

Nossos resultados mostraram que, nas concentrações usadas, o EAP não só não protegeu as células contra a peroxidação lipídica como também favoreceu danos oxidativos em ambos os sexos, principalmente nos machos. Resultados semelhantes foram obtidos com machos

tratados com o EOP, mas não com fêmeas, as quais não apresentaram alteração nas comparações antes-depois. A importância dos resultados de TBARS neste estudo foi demonstrar que extratos de plantas ricos em compostos antioxidantes, quando usados em concentrações altas, podem ter efeitos pró-oxidantes inesperados, e que tais efeitos podem ser dependentes do sexo.

6.2. Testes com voluntários atletas

Os polimorfismos de Mn-SOD, CAT, GPX1 e haptoglobina têm sido descritos como interessantes biomarcadores em associação com doenças (Taufer *et al.*, 2005; Ratnasinghe *et al.*, 2000; Wassel, 2000; Góth, 2001; Hu e Diamond, 2003; Góth *et al.*, 2004; Ichimura *et al.*, 2004; Sadrzadeh e Bozorgehr, 2004; Akyol *et al.*, 2005; Oberley, 2005; Ravn-Haren *et al.*, 2006; Carter e Worwood, 2007; Oh *et al.*, 2007). Desta forma, estudos que examinem a distribuição das frequências alélicas e genótípicas de tais marcadores em várias etnias poderão fornecer uma melhor compreensão de seu significado biológico para estudos antropogênicos e de associação com doenças.

Para Mn-SOD, as frequências dos alelos 1 ou T (Val – 57%) e 2 ou C (Ala – 43%) do grupo total foram mais próximas daquelas encontradas nos grupos controles por Stewart *et al.*, 2002 (Val – 52%; Ala – 48%), Ventriglia *et al.*, 2006 (Val – 52%; Ala – 48%) e Bica *et al.*, 2007 (Val – 59%; Ala – 41%), em estudos de associação com doenças, realizados respectivamente com amostras populacionais da Finlândia, da Itália e do sul do Brasil. Em diversos estudos, a variação das frequências alélicas foi relativamente pequena entre populações norte-americanas, do sul do Brasil, européias e australianas (Val: 44-59%; Ala: 41-56%) (Ambrosone *et al.*, 1999; Grasbon-Frodl *et al.*, 1999; Mitrunen *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 2002; Akyol *et al.*, 2004; Knight *et al.*, 2004; Olson *et al.*, 2004; Akyol *et al.*, 2005; Slinger *et al.*, 2006; Ventriglia *et al.*, 2006; Bica *et al.*, 2007; Johnatty *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008). Entretanto divergiram bastante das populações asiáticas, cujas frequências dos alelos Val e Ala variaram, respectivamente, entre 83-86% e 14-17% (Kimura *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2004).

Tendo em vista que o presente trabalho foi realizado com atletas e que esse marcador encontra-se sob pressão seletiva, nossos resultados sugerem que a heterozigose de Mn-SOD favorece a defesa contra o estresse oxidativo. Essa sugestão é baseada nos resultados obtidos com TGO, TGP e testes do cometa (ID controle) e de TBARS, uma vez que o genótipo SOD 1-2 (Val/Ala) apresentou os menores índices de danos nos tecidos e no DNA, bem como os menores índices de peroxidação lipídica. Além disto, exceto para TBARS, este genótipo foi o que também respondeu com redução significativa de danos após tratamento com pequi nos testes mencionados. Por outro lado, SOD 1-2 (Val/Ala) foi o único genótipo que apresentou redução

significativa, apesar de pequena, no hematócrito após o tratamento com pequi. No entanto, esta variável também foi influenciada por sexo e genótipos Hp e CAT, sendo discutida posteriormente.

Para GPX1 (Tabela 62), as frequências dos alelos 1 ou C (Pro – 68,8%) e 2 ou T (Leu – 31,2%) foram semelhantes principalmente àquelas encontradas em amostras populacionais de finlandeses e norte-americanos euro-descendentes e afro-americanos (Ratnasinghe *et al.*, 2000; Hu e Diamond, 2003; Knight *et al.*, 2004; Bastaki *et al.*, 2006; Lightfoot *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2007) e divergentes das frequências encontradas em amostras populacionais asiáticas (Bastaki *et al.*, 2006), onde a variante Leu é rara (Ratnasinghe *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2005).

Tabela 62 – Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo Pro198Leu do gene GPX1 em diversas populações.

Polimorfismo	Frequências genotípicas (%)			Frequências alélicas		População	Referência
	Pro/Pro (CC)	Pro/Leu (CT)	Leu/Leu (TT)	Pro (C)	Leu (T)		
GPX1 Pro198Leu	35	48	17	0,59	0,33	Europa	Forsberg <i>et al.</i> , 2000
	42	43	15	0,64	0,36	Finlândia	Ratnasinghe <i>et al.</i> , 2000
	47,2	40,4	12,4	0,67	0,33	USA	Hu e Diamond, 2003
	45,4	44,1	10,5	0,675	0,325	Canadá	Knight <i>et al.</i> , 2004
	46	46	8	0,69	0,31	Caucasianos	Bastaki <i>et al.</i> , 2006
	86,1	11,3	2,6	0,92	0,08	Asiáticos	Bastaki <i>et al.</i> , 2006
	60	35	5	0,8	0,2	Hispanicos	Bastaki <i>et al.</i> , 2006
	57,9	21,1	21,1	0,625	0,375	Outros	Bastaki <i>et al.</i> , 2006
	49	41	10	0,7	0,3	USA	Lightfoot <i>et al.</i> , 2006
	58	35	7	0,75	0,25	(Europa) Reino Unido	Lightfoot <i>et al.</i> , 2006
	54	36	10	0,72	0,28	Europa (Dinamarca)	Ravn-Haren <i>et al.</i> , 2006
	52	44	4	0,74	0,26	USA	Shinkai <i>et al.</i> , 2006
	42,9	44,5	12,6	0,65	0,35	Afro-americanos	Choi <i>et al.</i> , 2007

Já as frequências genotípicas (Pro/Pro – 48,8%; Pro/Leu – 40%; Leu/Leu – 11,2%) se aproximaram mais daquelas encontradas por Lightfoot *et al.* (2006), Hu e Diamond (2003) e Knight *et al.* (2004), sendo bem diferentes das encontradas em asiáticos por Bastaki *et al.* (2006) (Tabela 62).

Nos diversos estudos realizados com populações norte-americanas (caucasianos e afro-americanos) e européias, as frequências do genótipo Leu/Leu variaram de 4 a 21,1% (Forsberg *et al.*, 2000; Ratnasinghe *et al.*, 2000; Hu e Diamond, 2003; Knight *et al.*, 2004; Bastaki *et al.*, 2006; Lightfoot *et al.*, 2006; Ravn-Haren *et al.*, 2006; Shinkai *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2007). Embora a literatura envolvendo o polimorfismo Pro198Leu esteja voltada para estudos de associação com doenças, nossos resultados com atletas são concordantes e também sugerem que o alelo 1 (Pro), tanto em homozigose quanto em heterozigose, favorece a defesa contra o estresse oxidativo.

Apesar do genótipo 1-1 (Pro/Pro) ter exibido uma concentração de hemoglobina total significativamente menor do que o genótipo 1-2 ou Pro/Leu, apresentou valores de VCM (volume corpuscular médio) e de HCM (hemoglobina corpuscular média) semelhantes aos exibidos pelos heterozigotos e significativamente maiores que os mostrados por 2-2 (Leu/Leu). Além disto, somente os genótipos portadores do alelo 1 (Pro) apresentaram aumento significativo nos valores de HCM após o tratamento com pequi. Tendo em vista que VCM indica o volume de um eritrócito médio e HCM indica o conteúdo hemoglobínico de cada hemácia, ou seja, o peso da hemoglobina em uma célula média (Zago *et al.*, 2004), podemos inferir que indivíduos com portadores do alelo 1 (Pro) devem apresentar uma maior eficiência de cada célula no transporte de oxigênio.

Os resultados discutidos acima confirmam que tanto as frequências alélicas quanto as genotípicas variam de acordo com a etnia e a região geográfica. Uma vez que a Mn-SOD e a GPX1 são importantes enzimas que atuam na detoxificação do radical superóxido, reduzindo o estresse oxidativo intracelular (Ferreira e Matsubara, 1997; Akyol *et al.*, 2004; Hermes-Lima, 2004; Schneider e Oliveira, 2004; Barreiros *et al.*, 2006) e as variantes -9Ala e Leu têm sido relacionadas, respectivamente, com a redução da eficiência de Mn-SOD e de GPX1 (Shimoda-Matsubayashi *et al.* 1996; Ambrosone *et al.*, 1999; Hu e Diamond, 2003; Akyol *et al.*, 2004; Oberley, 2005; Zhao *et al.*, 2005; Shinkai *et al.*, 2006; Bica *et al.*, 2007) e associadas com doenças relacionadas ao estresse oxidativo e a mecanismos de defesa anormais contra os RL (Grasbon-Frodl *et al.*, 1999; Ratnasinghe *et al.*, 2000; Mitrunen *et al.*, 2001; Hu e Diamond, 2003; Cai *et al.*, 2004; Ichimura *et al.*, 2004; Olson *et al.*, 2004; Akyol *et al.*, 2005; Oberley, 2005; Taufer *et al.*, 2005; Ravn-Haren *et al.*, 2006; Slinger *et al.*, 2006; Bica *et al.*, 2007; Johnatty *et al.*, 2007; Kimura *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008), as variações étnicas devem ser investigadas e as diferenças devem ser incorporadas nos estudos dessas variantes de susceptibilidade.

Visto que o aumento da atividade de SOD e a redução da atividade de GPX têm sido reportados conjuntamente com desordens linfoproliferativas (Lightfoot *et al.*, 2006), a avaliação conjunta desses dois polimorfismos deve ser levada em conta nos estudos de associação. Como ambas as enzimas atuam na redução do estresse oxidativo causado pelo tabagismo (Zhao *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2009) e as atividades de Mn-SOD e GPX1 ainda são influenciadas respectivamente, por citoquinas e etanol (Martin *et al.*, 2009), e sexo e dieta (Bastaki *et al.*, 2006), tais fatores também devem ser levados em conta nos estudos de associação. Neste contexto,

nossos resultados sugerem que indivíduos com genótipo 1-2 (Val9Ala) da Mn-SOD e portadores do alelo 1 (Pro) da GPX1 são mais eficientes na detoxificação do radical superóxido e, consequentemente, na redução do estresse oxidativo intracelular, além de responderem melhor ao tratamento com pequi.

Para CAT (Tabela 63), as frequências dos alelos A (39,6%) e T (60,4%) foram mais próximas daquelas encontradas em populações européias por Ukkola *et al.* (2001) e Góth e Vitai (1997), e mais distantes daquelas encontradas por Flekac *et al.* (2008), em uma amostra populacional da República Tcheca, e por Lee *et al.* (2002), Mak *et al.* (2006), Park *et al.* (2006) e Young *et al.* (2006) em populações asiáticas. Quanto às frequências genotípicas, apenas aquelas encontradas por Ukkola *et al.* (2001) foram semelhantes às obtidas neste estudo. Em outros trabalhos realizados com amostras populacionais européias e asiáticas as frequências encontradas de homozigotos AA foram aproximadamente de duas a quatro vezes maiores do que as frequências de homozigotos TT (Lee *et al.*, 2002; Mak *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2006; Flekac *et al.*, 2008).

Tabela 63 – Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo –21A/T na região promotora do gene CAT em diversas populações.

Polimorfismo	Frequências genotípicas (%)			Frequências alélicas		População	Referência
	AA	AT	TT	A	T		
CAT –21A/T	–	–	–	0,44	0,56	Europa (Hungria)	Goth e Vitai, 1997
	17,62	47,95	34,43	0,42	0,58	Europa (Finlândia)	Ukkola <i>et al.</i> , 2001
	47,22	40,74	12,03	0,68	0,32	Ásia (Coreia)	Lee <i>et al.</i> , 2002
	48,1	51,9 (AT + TT)		0,693	0,307	Chineses (Hong Kong)	Mak <i>et al.</i> , 2006
	36,5	47,5	16,0	0,60	0,40	Ásia (Coreia)	Park <i>et al.</i> , 2006
	48	42	10	0,69	0,31	Ásia	Young <i>et al.</i> , 2006
	37	48	15	0,61	0,39	Europa Central	Flekac <i>et al.</i> , 2008

Apesar do polimorfismo em questão não ter sido associado com qualquer alteração na atividade de CAT (Góth *et al.*, 2004; Mak *et al.*, 2006), nossos resultados sugerem que a variante T, cuja frequência foi mais alta no grupo de atletas, parece favorecer a proteção contra o estresse oxidativo. Tal sugestão é apoiada nos resultados do eritrograma e do perfil lipídico obtidos neste estudo. Indivíduos com genótipo AT exibiram valores intermediários de hemácias, hematócrito e HCM, enquanto indivíduos TT, apesar de apresentarem valores menores de hemácias e de hematócrito (em relação a AA), exibiram valores de HCM semelhantes àqueles apresentados por

indivíduos AT e significativamente maiores do que os mostrados por indivíduos AA. Esses resultados sugerem uma maior eficiência de cada célula no transporte de oxigênio. Entretanto, apenas indivíduos AA e AT exibiram diferenças significativas nas comparações antes-depois do pequi, cujos valores de HCM aumentaram. Ao mesmo tempo, os genótipos AT e TT apresentaram valores de HDL semelhantes e significativamente mais altos dos que os exibidos pelo genótipo AA e valores de LDL também semelhantes entre si e mais baixos do que os apresentados pelo genótipo AA.

A redução significativa nos valores de hemácias e hematócrito para esses dois genótipos após o pequi será discutida posteriormente. Visto que a modificação oxidativa de LDL desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de doença coronariana (Magnusson *et al.*, 1994; Steinberg, 1997; Santos-Silva *et al.*, 2001; Mertens e Holvoet, 2001; Brouwers *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Laufs *et al.*, 2005; Kiechl *et al.*, 2007; Lamarão e Navarro, 2007) e que taxas elevadas de HDL reduzem o risco em adultos (Mertens e Holvoet, 2001; Pellanda *et al.*, 2002; Asleh, 2006), a presença do alelo T da CAT pode favorecer também a proteção cardiovascular. Como a CAT atua na detoxificação do peróxido de hidrogênio gerado pelas atividades das enzimas Mn-SOD e GPX1 (Ferreira e Matsubara, 1997; Forsberg *et al.* 2001b; Hermes-Lima, 2004; Schneider e Oliveira, 2004; Barreiros *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Cemeli *et al.*, 2009), o polimorfismo do gene da CAT deve ser avaliado conjuntamente com os polimorfismos dos genes da Mn-SOD e da GPX1 em estudos de associação. Neste contexto, nossos resultados sugerem que indivíduos com genótipo 1-2 (Val9Ala) da Mn-SOD e portadores dos alelos 1 (Pro) da GPX1 e T da CAT são mais eficientes na defesa contra ERO e, conseqüentemente, na redução do estresse oxidativo intracelular.

As frequências de Hp^{*1} e Hp^{*2} variam entre diferentes grupos étnicos e há igualmente uma diferença significativa na distribuição dos alelos de Hp^{*1F} e Hp^{*1S} nas diferentes populações (Carter e Worwood, 2007). Para haptoglobina, as frequências dos alelos Hp^{*1} (50,8%) e Hp^{*2} (49,2%) na amostra de atletas foram semelhantes àsquelas encontradas por Miranda-Vilela *et al.* 2009 (Hp^{*1} – 49,6%; Hp^{*2} – 49,4%) em estudo realizado com uma amostra populacional de não-atletas de Brasília, sendo também próximas daquelas encontradas por Tondo *et al.* (1963) em estudo realizado com uma amostra de afro-descendentes do Rio Grande do Sul (Hp^{*1} – 55%; Hp^{*2} – 45%). Entretanto, quando foram analisados os subtipos de Hp^{*1} , a frequência de Hp^{*1F} (17,6%) se aproximou mais das frequências encontradas em amostras populacionais australianas (16,8%) e européias (15% e 16%) (Lai *et al.*, 1986; Borresen *et al.*, 1987; Krüger e Püschel, 1993), enquanto a frequência de Hp^{*1S} (33,2%) foi intermediária entre as frequências encontradas por Moreira *et al.*, 2009 (27,4%) e Miranda-Vilela *et al.*, 2009 (39,4%) em dois estudos realizados com amostras populacionais diferentes de não-atletas de Brasília.

Apesar da frequência de $Hp1-1$ (28,8%) ter se aproximado somente das frequências encontradas por Wobeto *et al.*, 2007 (25,35%) e Miranda-Vilela *et al.*, 2009 (32%) em estudos

realizados com amostras populacionais brasileiras, a frequência de Hp2-1 (44%) foi semelhante àsquelas encontradas em populações brasileiras, africanas e européias (Langlois *et al.*, 2000; Awadallah, 2003; Koch *et al.*, 2003; Langlois *et al.*, 2004; Fowkes *et al.*, 2006; Wobeto *et al.*, 2007). A frequência de Hp2-2 (27,2%) somente se aproximou daquelas encontradas em populações brasileiras por Wobeto *et al.*, 2007 (32,3%) e Miranda-Vilela *et al.*, 2009 (30%), sendo mais baixas do que as frequências de Hp2-2 encontradas em amostras populacionais australianas, européias e asiáticas e mais semelhantes às frequências encontradas em amostras populacionais africanas (Lai *et al.*, 1986; Levy *et al.*, 2004; Van Vlierberghe *et al.*, 2004).

Nossos resultados do eritrograma sugerem que a frequência mais alta de indivíduos Hp2-1 pode estar associada a uma maior capacidade de transporte de oxigênio, uma vez que tal genótipo apresentou a maior concentração de hemácias/mm³ de sangue e o maior percentual de hematócrito, sendo significativamente diferente de Hp1-1, que apresentou valores intermediários e de Hp2-2, que exibiu menores valores; os valores dos índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM foram semelhantes entre os três genótipos. Visto que Hp2-2 apresentou os menores valores de MDA no teste de TBARS sua menor frequência na amostra de atletas pode ser decorrente de uma menor capacidade aeróbica em relação aos outros genótipos.

Tem sido demonstrado que a haptoglobina pode atuar como molécula antioxidante, dada a sua capacidade de ligação com a hemoglobina livre, reduzindo a geração de RL mediada pelo ferro (Langlois *et al.*, 1997; Melamed-Frank, 2001; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004; Levy, 2004; Tseng *et al.*, 2004; Coelho *et al.*, 2006; Guéye *et al.*, 2006). No entanto, tal capacidade antioxidante difere entre os tipos de Hp, sendo maior em Hp1-1, intermediária em Hp2-1 e menor em Hp2-2 (Langlois e Delanghe, 1996; Wassel, 2000; Sadrzadeh e Bozorgehr, 2004; Van Vlierberghe *et al.*, 2004; Guéye *et al.*, 2006). Porém, normalmente há um excesso de Hp em relação à Hb livre e neste caso, as diferenças na função dos tipos de Hp não são significativas (Melamed-Frank *et al.*, 2001; Guéye *et al.*, 2006; Carter e Worwood, 2007). Já no caso de diabetes melitus ou de hemólise, tais diferenças podem ser importantes, uma vez que, em decorrência de sua alta massa molecular, Hp^{*2} tem menor acesso aos espaços extravasculares (Langlois e Delanghe, 1996; Wassel, 2000; Melamed-Frank *et al.*, 2001; Sadrzadeh e Bozorgehr, 2004; Van Vlierberghe *et al.*, 2004; Carter e Worwood, 2007). Neste contexto, nossos resultados foram concordantes com a literatura, uma vez que os menores valores de peroxidação lipídica exibidos por Hp2-2 no teste de TBARS não foram estatisticamente diferentes dos apresentados por Hp1-1.

Apesar de termos trabalhado somente com o perfil lipídico pós-prandial, nossos resultados foram concordantes com aqueles obtidos por Borresen *et al.* (1987) no que concerne à associação entre Hp2-2 e níveis significativos mais altos de HDL. Uma vez que a oxidação de LDL exerce importante papel na iniciação e na progressão das lesões ateroscleróticas (Magnusson *et al.*, 1994; Steinberg, 1997; Santos-Silva *et al.*, 2001; Mertens e Holvoet, 2001; Brouwers *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Laufs *et al.*, 2005; Kiechl *et al.*, 2007; Lamarão e Navarro, 2007) e a relação

inversa entre HDL e risco de doenças cardiovasculares já está bem estabelecida (Mertens e Holvoet, 2001; Pellanda *et al.*, 2002; Asleh, 2006), nossos resultados são discordantes da literatura que associa Hp2-2 com aumento de risco de doenças cardiovasculares (Langlois e Delanghe, 1996; Levy *et al.*, 2002; Roguin *et al.*, 2003; Levy *et al.*, 2004; Suleiman *et al.*, 2005). Visto vez que Hp2-2 também exibiu valores de HDL significativamente mais altos do que os outros genótipos e valores de LDL semelhantes a Hp1-1 e Hp2-1, seria de se esperar uma maior proteção cardiovascular, pelo menos no que diz respeito à oxidação de LDL.

Por outro lado, o presente trabalho foi realizado com atletas, diferentemente dos estudos de associação anteriormente mencionados. Além disto, as amplas diferenças nas frequências dos tipos de Hp entre os diferentes grupos étnicos sugere a possibilidade de que populações distintas possam ter susceptibilidade a doenças particulares e vários trabalhos concluem que não há nenhuma associação entre os tipos de Hp e uma doença específica. Esses relatos contrastantes podem indicar que quaisquer associações são questionáveis (Carter e Worwood, 2007), sendo necessário caracterizar e estudar a distribuição de polimorfismo de Hp nas diferentes populações para maiores esclarecimentos.

Em relação aos subtipos de Hp, os artigos são mais escassos. Entretanto, a frequência de Hp1S-2 (28%) e Hp1F-2 (16%) foram próximas daquelas encontradas em amostras populacionais de não-atletas de Brasília (Hp1S-2: 30% – Miranda-Vilela *et al.*, 2009; Hp1F-2: 14,5% – Moreira *et al.*, 2009) e em amostras européias (Hp1S-2: 27%; Hp1F-2: 19% – Koch *et al.*, 2003). A frequência de Hp1S-1S (16%) se aproximou mais daquela encontrada por Miranda-Vilela *et al.* (2009) em amostra populacional de Brasília (20%); a de Hp1F-1S (6,4%) foi mais próxima de europeus (7% – Koch *et al.*, 2003); e a de Hp1F-1F (6,4%), mais próxima de uma amostra de não-atletas de Brasília (4,8% – Moreira *et al.*, 2009). Uma vez que no presente estudo não houve diferença significativa entre Hp1F-2 e Hp1S-2 nos resultados obtidos com eritrograma, HDL e TBARS, as sugestões são as mesmas feitas anteriormente para Hp2-1.

A realização de exercícios extenuantes ou com frequência de treinamento muito elevada promove uma sobrecarga oxidativa tanto nos músculos esqueléticos quanto em muitos outros órgãos e sistemas corporais responsáveis pela regulação e manutenção da homeostase (Cruzat *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Lecarpentier, 2007). Neste contexto, o aumento da concentração de proteínas citosólicas como TGO, TGP e CPK na circulação após o exercício reflete a lesão tissular (Bruce *et al.*, 1958; Dewar *et al.*, 1958; Almersjö *et al.*, 1968; Chalifoux e Lagacé, 1969; Barbosa *et al.*, 2003; Foschini *et al.*, 2007).

Nossos resultados mostraram que houve decréscimo significativo nos valores de TGO e TGP após suplementação com óleo de pequi e que este decréscimo foi particularmente relacionado ao sexo feminino. Por outro lado, apesar do teste de ANOVA ter indicado que apenas o sexo influenciou nos resultados de CPK, houve decréscimo nos valores da média (21,35%) e do

erro padrão da média (35,66%) desta enzima citosólica para o sexo masculino após suplementação com o óleo de pequi.

A enzima TGO é encontrada principalmente no fígado, coração, músculos esqueléticos, rins, pâncreas e eritrócitos (Dewar *et al.*, 1958), enquanto a enzima TGP é encontrada em altas concentrações apenas no fígado (Bruce *et al.*, 1958; Dewar *et al.*, 1958; Almersjö *et al.*, 1968; Chalifoux e Lagacé, 1969). Tendo em vista que o pequi contém diversos tipos de carotenóides (Ramos *et al.*, 2001; Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, 2004; Oliveira *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2007), substâncias reconhecidas pela sua alta capacidade antioxidante (Hermes-Lima, 2004; Gomes *et al.*, 2005), especialmente em condições de baixa tensão de O₂ (Ferreira e Matsubara, 1997; Gomes *et al.*, 2005), nossos resultados sugerem que o óleo de pequi foi particularmente eficiente em reduzir o estresse oxidativo de células e órgãos submetidos ao fenômeno de isquemia-reperfusão nas mulheres.

A enzima CPK está presente em altas concentrações nos músculos esquelético e cardíaco e em menor extensão no tecido cerebral (Griffiths, 1964) e sua concentração sérica está sujeita as variações fisiológicas como sexo, idade, massa muscular, tipo de exercício realizado e etnia (Foschini *et al.*, 2007). O soro normal contém em torno de 94-100% de CPK-MM (Foschini *et al.*, 2007), isoforma predominantemente encontrada no músculo esquelético e no miocárdio (Apple *et al.*, 1988; Foschini *et al.*, 2007). Visto que CPK é o marcador bioquímico mais utilizado na literatura como indicador da ocorrência de lesão muscular, sobretudo após exercícios extenuantes realizados por indivíduos sem enfermidades (Barbosa *et al.*, 2003; Foschini *et al.*, 2007), nossos resultados também sugerem que o óleo de pequi foi particularmente eficiente em reduzir as lesões oxidativas nos músculos de atletas do sexo masculino.

Uma vez que os resultados discutidos anteriormente indicam que a proteção suprida pelo pequi contra danos oxidativos avaliados por TGO, TGP e CPK é sexo-dependente, o papel dos hormônios sexuais na proteção antioxidante deve ser levado em conta. Além de sua função clássica como um esteróide sexual, os efeitos benéficos do estrógeno são considerados como decorrentes de sua capacidade de melhorar a defesa contra o estresse oxidativo (Moosmann e Behl, 1999; Lorenzo, 2003). Neste contexto, os resultados significativos de decréscimo em TGO e TGP após suplementação apenas para o sexo feminino sugerem ação conjunta do efeito antioxidante do estrógeno e do óleo de pequi.

Por outro lado, nossos resultados com CPK mostraram proteção somente para o sexo masculino, indicando que a testosterona pode ter algum papel na defesa contra o estresse oxidativo nos músculos. Os resultados obtidos por Klapcińska *et al.* (2008) sugerem que, pelo menos em ratos, a testosterona endógena pode exercer um papel indireto na defesa antioxidante, o mesmo não ocorrendo com a reposição hormonal. Os autores observaram que a castração de ratos afetou significativa e negativamente o estado antioxidante do ventrículo esquerdo, tanto pela redução das enzimas antioxidantes quanto pelo aumento da peroxidação lipídica. Todavia, o

restabelecimento de níveis fisiológicos de testosterona sérica através de reposição hormonal resultou em tendência maior de decréscimo do estado antioxidante dos tecidos do ventrículo esquerdo. Então, com base em nossos resultados de CPK e nos resultados obtidos por Klapcińska *et al.* (2008), nós podemos sugerir que a testosterona deve exercer um papel indireto na defesa contra o estresse oxidativo, provavelmente por estimular as atividades das enzimas antioxidantes nos músculos.

Visto que o exercício exaustivo também induz dano no DNA de leucócitos circulantes (Nies *et al.*, 1996; Mastaloudis *et al.*, 2004; Demirbag *et al.*, 2006), nossos resultados com o teste do cometa demonstraram que o óleo de pequi foi biologicamente eficiente em reduzir os danos no DNA, tanto do grupo total quanto de ambos os sexos. Os resultados do teste T, significativo para homens e altamente significativo para mulheres, reforçam a idéia da contribuição dos efeitos antioxidantes do estrógeno para o sexo feminino.

É importante ressaltar que, apesar do sistema antioxidante trabalhar em paralelo com o sistema de reparo e o treinamento físico ser um conhecido indutor de enzimas antioxidantes (Sureda *et al.*, 2005; Radak *et al.*, 2007), o exercício exaustivo ou o treinamento intenso e prolongado ultrapassa a capacidade antioxidante endógena e geralmente resulta em lesão oxidativa (Sureda *et al.*, 2005; Cruzat *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Lecarpentier, 2007). Neste contexto, as faixas etárias e a distância percorrida devem ser igualmente consideradas, uma vez que o aumento de danos oxidativos relacionados ao envelhecimento tem sido bem documentado, que músculos envelhecidos exibem uma capacidade de adaptação antioxidante inferior aos músculos jovens e que exercícios físicos extenuantes aumentam a geração de ERO (Leeuwenburgh *et al.*, 1994; Bejma *et al.*, 2000; Schneider e Oliveira, 2004; Cruzat *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007; Judge e Leeuwenburgh, 2007; Radak *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008). Nossos resultados indicaram que a proteção fornecida pelo óleo de pequi contra danos nos tecidos (avaliados por TGO) e no DNA foi mais eficiente somente para grupos mais jovens e para a distância percorrida de até 10 Km. Isto sugere que corridas de longas distâncias podem ser prejudiciais, principalmente para atletas mais velhos, devido ao aumento do estresse oxidativo acima da capacidade de adaptação do organismo, mesmo com o uso de suplementos antioxidantes.

Estudos mostram que atletas, especialmente os de resistência, tendem a desenvolver uma condição conhecida como anemia esportiva ou pseudoanemia, que pode ocorrer no início de um programa de treinamento ou durante um treinamento prolongado. Reduções transitórias na concentração de hemoglobina, na contagem de hemácias e de hematócrito que caracterizam esta condição, são decorrentes da expansão do volume plasmático como uma adaptação fisiológica aos exercícios extenuantes. Tal aumento no volume plasmático pode ser benéfico devido ao decréscimo na resistência ao fluxo sanguíneo, melhora na sudorese e maior volume de ejeção, ou seja, maior volume de sangue ejetado pelo ventrículo esquerdo durante a sístole (Eichner, 1992;

Eichner, 1996; Eichner, 1998; Eichner, 2002). Como a anemia do esportista é uma falsa anemia, a hemólise que ocorre com a prática de atividade física, dificilmente causa uma anemia. Portanto, a principal causa da verdadeira anemia em atletas é ocasionada pela ingestão deficiente de ferro (Eichner, 2002). Neste contexto, os resultados do presente trabalho sugerem que a tendência geral de redução de hemácias, hemoglobina e hematócrito após a suplementação com óleo de pequi foi principalmente decorrente de uma maior expansão do plasma e não de hemólise, e que estes resultados foram influenciados por sexo, idade (exceto hematócrito) e genótipos Hp (hemácias, hemoglobina e hematócrito), Mn-SOD (hematócrito), CAT (hemoglobina e hematócrito) e GPX1 (hemoglobina).

Uma vez que os valores de referência para hemácias, hemoglobina e hematócrito diferem entre homens e mulheres e que pesquisas com atletas de resistência do sexo feminino revelam que estas não apresentam apenas uma redução na concentração de hemoglobina relacionada a uma hemodiluição, mas também um estado de deficiência de ferro com ou sem anemia (Carlson e Mawdsley, 1986; Eichner, 1998; Vilardi *et al.*, 2001), é de se esperar que os resultados apresentados acima tenham sido também influenciados pelo sexo. Dentro do contexto apresentado e mediante os resultados obtidos no presente estudo, pode ser inferido que as atletas com maior deficiência de ferro estavam incluídas preferivelmente na faixa etária de 25–29 anos, que apresentou a menor concentração de hemoglobina e se diferenciou das demais.

Quanto aos valores de RDW, nossos resultados demonstraram que houve uma redução significativa após suplementação com óleo de pequi. Uma vez que RDW (amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos; do inglês *Red Cell Distribution Width*) avalia o grau de anisocitose na população de hemácias (Zago *et al.*, 2004) e que tem sido sugerido que exercícios intensos de longa duração e treinamentos exaustivos podem comprometer nossa capacidade de detoxificar ERO dentro das células sanguíneas e os eritrócitos parecem muito mais vulneráveis aos danos oxidativos (Petibois e Délérís, 2005; Sureda *et al.*, 2005), nossos resultados mostraram que o óleo de pequi foi eficiente em proteger os eritrócitos contra as lesões oxidativas decorrentes do exercício. Visto que a idade e a distância percorrida também influenciaram nas respostas da variável RDW ao pequi, a maior redução da anisocitose após o pequi observada na faixa etária de 25–29 anos e na distância percorrida de 16–21 Km corroboram a afirmação de proteção acima. Adicionalmente, após a suplementação com pequi, os valores de RDW que se encontravam acima da normalidade se apresentaram dentro dos valores de referência considerados normais, exceto para as faixas etárias de 35–39 anos e ≥45 anos e para a distância percorrida de 16–21 Km, as quais também exibiram maior anisocitose antes do pequi.

A atividade física exaustiva pode iniciar reações que se assemelham à fase aguda da resposta imune à infecção, resultando em aumento de neutrófilos e redução de linfócitos (Santos-Silva *et al.*, 2001; Mooren *et al.*, 2002; Cazzola *et al.*, 2003; Petibois e Délérís, 2004; Petibois e Délérís, 2005; Sureda *et al.*, 2005; Yusof *et al.*, 2007). Existem também várias evidências

demonstrando que o número de monócitos transientes aumenta de 50-100% no sangue periférico em resposta ao exercício agudo (Woods *et al.*, 2000). Pode também haver mudanças nas subpopulações de monócitos dependendo da intensidade ou duração do exercício, de forma que monócitos maduros podem migrar para fora da circulação (Woods *et al.*, 2000).

No presente trabalho, apesar da tendência geral de redução de linfócitos após a suplementação com óleo de pequi, houve também uma tendência de redução de neutrófilos maduros (segmentados) e aumento de monócitos na circulação, não havendo alteração na população de neutrófilos jovens (bastonetes). Uma vez que após o exercício exaustivo, inicialmente os neutrófilos e posteriormente os monócitos e os linfócitos são recrutados para o local de inflamação (Cruzat *et al.*, 2007) e considerando que nos resultados discutidos anteriormente houve redução das lesões oxidativas nos tecidos após a suplementação, podemos inferir que o óleo de pequi foi biologicamente eficiente em reduzir a inflamação (apesar do teste de ANOVA ter indicado que não houve influência do pequi). Isto porque, em decorrência da redução dos danos oxidativos nos tecidos após o pequi, não houve necessidade de mobilizar monócitos para fora da circulação, o que provocou seu aumento. Ao mesmo tempo, devido à redução do processo inflamatório, houve redução de neutrófilos maduros e de linfócitos e não houve alteração de neutrófilos jovens, indicando que não houve aumento da leucopoeia pela medula óssea. Visto que o aumento de monócitos foi maior para o sexo feminino (em níveis de significância superiores a 6,28%), os resultados novamente conduzem à sugestão de contribuição dos efeitos antioxidantes do estrógeno.

Os exercícios físicos exaustivos e de alta intensidade também podem favorecer a aterosclerose e o risco cardiovascular (Schneider e Oliveira, 2004), uma vez que têm sido associados com o aumento do estresse oxidativo no endotélio vascular (Laufs *et al.*, 2005; Petibois e Délérís, 2005), da viscosidade do sangue e da leucocitose (Santos-Silva *et al.*, 2001). A viscosidade elevada do sangue e do plasma pode contribuir com a aterotrombose por prejudicar o fluxo sanguíneo, danificar a interface endotelial, facilitar a interação de proteínas plasmáticas com o endotélio nas zonas de re-circulação pós-estenóticas e aumentar a propensão a trombose (Rosenson e Lowe, 1998). Por sua vez, a disfunção endotelial está associada com o aumento da adesão plaquetária, da atividade pró-coagulante e da fibrinólise. Sendo assim, as plaquetas desempenham papel importante na patogênese da trombose e da aterosclerose. Quando ativadas, interagem com o endotélio e as células inflamatórias por ação da glicoproteína P-selectina (CD62p), contribuindo para eventos isquêmicos tromboembólicos (Santos *et al.*, 2007b).

O aumento do volume plaquetário médio (VPM) é um dos indicadores da ativação de plaquetas (Santos *et al.*, 2007b; Santos *et al.*, 2008) e houve redução (não significativa) na média desta variável (dados não apresentados) antes e depois do tratamento com pequi ($10,54 \pm 0,15$ antes e $10,37 \pm 0,1$ depois), bem como redução significativa nos valores do plaquetócrito ($p=0,0001$; dados não apresentados) e das plaquetas. Portanto, esses resultados corroboram a

afirmação prévia de que o óleo de pequi foi eficiente em reduzir a inflamação e a viscosidade do sangue provocada por aumento da leucocitose e de plaquetas; consequentemente, também foi eficiente em reduzir o risco cardiovascular. Tal afirmação ainda tem apoio nos resultados obtidos com as diferentes faixas etárias e distâncias percorridas, visto que houve redução significativa nos valores das plaquetas para quatro das sete faixas etárias, incluindo a de 25–29 anos, e para duas das quatro faixas de distância percorrida (6–7 Km e 8–10 Km), bem como grande redução nos valores desta variável para a distância percorrida de 16–21 anos após o pequi.

Nossos resultados também demonstraram que os exercícios agudos promovem alterações na série plaquetária, particularmente nos valores de plaquetócrito e PDW (índice de variação no tamanho da população de plaquetas), visto que ambos estavam maiores do que os valores de referência após a primeira corrida (sem pequi). Porém, a média dos valores de PDW (dados não mostrados) praticamente não se alterou antes e depois do tratamento com pequi ($18,01 \pm 0,11$ antes e $18,11 \pm 0,01$ depois) e o plaquetócrito, apesar de exibir redução significativa em seus valores, estes ainda permaneceram mais altos do que os de referência ($0,36 \pm 0,01$ antes e $0,33 \pm 0,01$ depois). Tendo em vista que o VPM está geralmente aumentado quando há um aumento do *turnover* plaquetário e consequentemente defeito de produção (Santos *et al.*, 2008) e que tais valores permaneceram dentro da normalidade antes e depois do pequi, podemos inferir que as alterações observadas foram decorrentes de adaptação fisiológica ao exercício agudo.

Além dos fatores de risco clássicos relacionados à doença arterial coronariana (DAC) tais como obesidade, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, sedentarismo e diabetes melitus, outros fatores de risco chamados de emergentes ou não clássicos têm sido estudados, e entre eles a lipemia pós-prandial tem sido vista como um possível marcador precoce de anormalidades metabólicas e disfunção vascular ainda não observados em jejum (Signori *et al.*, 2007). No estado pós-prandial, uma elevação estável de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (LDL e VLDL) por muito tempo pode causar alterações envolvidas na aterogênese, tais como disfunção endotelial, menor disponibilidade do óxido nítrico e maior estresse oxidativo (Anderson *et al.*, 2001; Signori *et al.*, 2007). Enquanto LDL oxidadas favorecem a aterosclerose por estimularem a adesão e a agregação plaquetária, a infiltração de monócitos e a migração e a proliferação de células musculares lisas, HDL tem propriedades antitrombóticas diretas, através de inibição da agregação de plaquetas e de eritrócitos, redução da viscosidade do sangue e supressão de fatores de ativação plaquetária (Rosenson e Lowe, 1998; Mertens e Holvoet, 2001). Neste contexto, a tendência geral de redução de colesterol total e LDL, bem como de aumento de HDL observados para o grupo total após o tratamento com pequi contribuem para a afirmação prévia de que o óleo de pequi foi biologicamente eficiente em reduzir a inflamação, a viscosidade do sangue e o risco cardiovascular. Entretanto, pelo menos em relação ao perfil lipídico pós-prandial, tal proteção foi influenciada por sexo, idade, distância percorrida e genótipos CAT e Hp.

O sexo masculino é geralmente considerado um fator de risco independente para a doença cardiovascular (DCV). O predomínio de DCV em homens tem sido atribuído em parte a diferenças nos níveis lipídicos entre os sexos e supõe-se que tais diferenças sejam decorrentes de modulação diferente pelos esteróides sexuais. Na puberdade os níveis de HDL decrescem em paralelo com o aumento dos níveis da testosterona sérica; em homens adultos, os níveis mais baixos de HDL são comparáveis àqueles observados em mulheres na pré-menopausa (Pottelbergh *et al.*, 2003). Mediante a composição química do pequi (Almeida, 1998; Lima *et al.*, 2007), existem evidências para sugerirmos que o consumo do óleo de pequi pode influenciar o metabolismo de lipídeos (López *et al.*, 2007) e nossos resultados sugerem que tal influência depende do sexo, da idade do consumidor e, para HDL, também dos genótipos CAT e Hp. No caso da influência dos genótipos, apenas Hp1F-1F apresentou aumento significativo de HDL após o tratamento com pequi, não havendo alteração significativa nesses valores para nenhum genótipo CAT.

De acordo com o consagrado estudo de Framingham, cada 1 mg/dL de aumento no HDL está associado com uma redução de 2% no risco de doença arterial coronariana (DAC) nos homens e de 3% nas mulheres (Mertens e Holvoet, 2001). Desta forma, a redução do colesterol total e do LDL e o aumento de HDL observado para ambos os sexos após o pequi, apesar de não significativos, indicaram que o óleo de pequi foi biologicamente eficiente em reduzir o risco cardíaco em homens e mulheres. O maior aumento de HDL e a maior redução de colesterol total e de LDL observados para o grupo de mulheres após o tratamento com pequi apóiam a suposição de modulação diferente do perfil lipídico pelos esteróides sexuais e mais uma vez corroboram a proposta do papel protetor do estrógeno. Considerando-se que: (1) os efeitos da dieta nos lipídeos do sangue são mais bem conhecidos em homens; (2) diversos estudos, mas não todos, notaram que o perfil lipídico das mulheres é menos responsivo à dieta do que o dos homens; (3) na maioria desses estudos não foram feitas comparações estatísticas entre homens e mulheres e o tamanho amostral das mulheres foi pequeno (Obarzanek *et al.*, 2001), nosso estudo pode contribuir com um maior conhecimento dos efeitos da dieta no perfil lipídico de ambos os sexos.

Levando-se em conta que os valores de referência para colesterol total são diferentes para a faixa etária de 2–19 anos, é de se esperar que a faixa de 15–19 anos tenha apresentado diferenças em relação às demais idades para esta variável e outras relacionadas. Conforme o estudo de Framingham, níveis elevados de colesterol LDL e baixos de HDL são fatores preditores de DAC em homens e mulheres acima de 49 anos (Mertens e Holvoet, 2001; Polanczyk, 2005). Adicionalmente, as recomendações dietéticas atuais para redução de risco de DCV enfatizam uma menor ingestão de ácidos graxos saturados (AGS), especialmente de ácido palmítico, em prol de uma maior ingestão de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), principalmente de ácido oléico (López *et al.*, 2007). Por outro lado, a relação entre maior ingestão de AGS e aumento de LDL não é uma característica geral dos ácidos graxos saturados; o ácido esteárico não exibe esta característica (Nestel *et al.*, 1994). Visto que o consumo de óleos ricos em ácidos graxos

monoinsaturados (AGMI) tem sido recomendado como estratégia para modular o perfil lipídico do plasma em humanos (Heyden, 1994), nossos resultados de redução de LDL após suplementação, significativos para a faixa etária ≥ 45 anos, estão de acordo com a literatura e evidenciam que o óleo de pequi foi eficiente em diminuir o risco cardíaco de indivíduos incluídos na faixa etária de maior risco. Os resultados obtidos com triglicerídeos sustentam esta afirmação, uma vez que o aumento de triglicerídeos tem sido relacionado ao aumento da incidência de DAC em pacientes com níveis elevados de LDL e baixos de HDL (Cullen, 2000) e após tratamento com pequi houve tendência de redução de triglicerídeos em função do aumento da faixa etária, particularmente a partir de 35–39 anos.

Durante os exercícios físicos, ácidos graxos não-esterificados são o substrato lipídico mais importante; a taxa de oxidação é aumentada profundamente, representando mais de 60% da energia gasta. Todavia, os ácidos graxos podem também ser derivados de hidrólise intramuscular de triglicerídeos. Exercícios prolongados estão associados a um pequeno decréscimo na concentração plasmática de triglicerídeos, o que pode também refletir o uso de LDL como combustível ou pode ser atribuído à redução da secreção hepática de VLDL. No estado pós-prandial, as concentrações elevadas de lipoproteínas ricas em triglicerídeos representam uma fonte potencial de ácidos graxos para os músculos e podem ser importantes no reabastecimento muscular de triglicerídeos após o exercício. Desde o final dos anos 60 já é conhecido que uma sessão de exercícios diminui a lipemia pós-prandial. O exercício igualmente influencia a atividade intestinal pós-prandial (Hardman, 1998). Neste contexto, a tendência de redução do colesterol total e de LDL com o aumento da distância percorrida, bem como diferenças entre as faixas de quilômetros percorridos já eram esperados e estão de acordo com a literatura.

Pelo fato do processo fisiopatológico da aterosclerose envolver oxidação e inflamação, os marcadores inflamatórios assumem um papel muito importante na predição dos riscos de doenças coronarianas, sendo inclusive um dos fatores considerados como não-clássicos ou emergentes para DCV (Casella Filho *et al.*, 2003; Signori *et al.*, 2007). Alguns marcadores, como a PCR ultrasensível, se mostraram úteis como adjuntos aos fatores de risco tradicionais para DAC (Casella Filho *et al.*, 2003). Sua avaliação agrega valor preditivo às dosagens do colesterol na determinação do risco de um primeiro evento cardiovascular em homens e mulheres saudáveis (Potsch *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos no presente estudo com a dosagem sérica de PCR-US apóiam a afirmação que o óleo de pequi foi eficiente em reduzir o risco cardiovascular em homens, uma vez que a tendência de redução dos valores da PCR-US observada após tratamento com o óleo de pequi foi particularmente relacionada ao sexo masculino, considerado por si só como um fator de risco para DCV (Pottelbergh *et al.*, 2003). Tal afirmação também é sustentada pelo teste de TBARS, que avalia a peroxidação lipídica no plasma (Clarkson e Thompson, 2000). Apesar da análise de variância ter indicado que nem o tratamento com pequi nem o sexo influenciaram nos

resultados, houve redução nos valores de MDA para o sexo masculino após pequi, sendo esta particularmente relacionada à distância de 6–7 Km pelo teste T para amostras dependentes (dados não apresentados). Visto que durante a puberdade os níveis de HDL decrescem no sexo masculino em paralelo com o aumento dos níveis da testosterona sérica (Pottelbergh *et al.*, 2003) é de se esperar maiores valores de peroxidação lipídica para a faixa etária de 15–19 anos, como observado no presente estudo.

Uma vez que o exercício agudo, sobretudo se inabitual ou exaustivo, induz estresse oxidativo (Ji, 1995; Alessio *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2007) e os atletas de elite participaram neste estudo de corridas a partir de 6 Km, é de se esperar influência da distância percorrida e maior peroxidação lipídica para a faixa de 4–5 Km. Apesar da redução nos valores de MDA só ter sido significativa para a distância de 6–7 Km, houve também redução da peroxidação lipídica para as faixas de 8–10 e 16–21 Km após a suplementação, indicando que o óleo de pequi foi biologicamente eficiente em reduzir a peroxidação lipídica em atletas treinados.

Estudos epidemiológicos sobre as gorduras da dieta não mostraram relação clara entre a pressão sanguínea e o total de gordura consumida (Qizilbash, 1987; Soriguer *et al.*, 2003). Uma associação positiva entre a quantidade estimada de gorduras saturadas da dieta e a pressão sanguínea foi reportada em alguns estudos epidemiológicos, mas não em outros (Soriguer *et al.*, 2003). Entretanto, uma associação entre redução de gordura saturada na dieta e queda da pressão sanguínea já foi demonstrada na literatura (Obarzanek *et al.*, 2001; Soriguer *et al.*, 2003). Apesar de poucos estudos epidemiológicos com pequenas amostras populacionais sugerirem que uma maior ingestão de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) é inversamente relacionada à pressão sanguínea, outros estudos com maiores amostras populacionais não encontraram essa correlação (Soriguer *et al.*, 2003). Porém, algumas evidências suportam a hipótese de que uma alta taxa de AGPI/AGS (ácidos graxos poliinsaturados/ácidos graxos saturados) na dieta exerce efeito hipotensivo. Apesar da influência da gordura da dieta na pressão sanguínea ser pequena, ela tem um efeito considerável na saúde pública (Qizilbash, 1987).

Nesse estudo, a redução significativa da pressão arterial (sistólica e diastólica) para o grupo total e para ambos os sexos após suplementação com óleo de pequi apóia a sugestão anterior de que um maior consumo de AGMI é inversamente relacionado à pressão sanguínea. Mediante a composição lipídica do óleo de pequi e nossos resultados, podemos sugerir que não só uma alta taxa de AGPI/AGS na dieta, mas também uma alta taxa de AGPI-AGMI/AGS exercem um efeito hipotensivo.

Desde a década de 1990, estudos demonstram que os efeitos cardiovasculares da pressão sistólica versus diastólica variam de acordo com a idade. No estudo de Framingham há uma transição gradual da pressão diastólica para a sistólica como fator de prognóstico mais importante de risco cardiovascular. Para participantes com menos de 50 anos, a pressão diastólica

é um melhor preditor de desenvolvimento de DAC. Entretanto, entre 50 e 59 anos, há um período de transição entre pressão sistólica e diastólica, cujos valores assumem risco comparável. Após os 60 anos, o risco de DAC permanece positivamente correlacionado a pressão sistólica, mas inversamente relacionado à pressão diastólica. Isto é, após os 60 anos, níveis mais baixos de pressão diastólica são associados a uma piora na prognose cardiovascular (Nishizaka e Calhoun, 2006). Como no presente estudo houve redução nos valores da pressão diastólica em todas as faixas etárias após suplementação e, com exceção da faixa de 30–34 anos, também houve redução na pressão sistólica, tais resultados sugerem um possível efeito hipotensivo e cardioprotetor do óleo de pequi, particularmente para a faixa etária de maior risco cardiovascular (≥ 45 anos).

7. CONCLUSÕES

- 1- Os extratos aquoso e orgânico não tiveram efeito clastogênico ou genotóxico e ambos protegeram os camundongos contra danos oxidativos no DNA induzidos por bleomicina ou ciclofosfamida. Entretanto, o efeito protetor dependeu da dose.
- 2- O extrato aquoso elevou a peroxidação lipídica nos camundongos de ambos os sexos, especialmente nos machos e o extrato orgânico aumentou a peroxidação lipídica apenas nos machos, sem efeitos nas fêmeas.

Em atletas e nas condições em que o trabalho foi realizado, podemos sugerir que:

- 3- O óleo de pequi foi eficiente em reduzir lesões oxidativas avaliadas por TGO e TGP particularmente nas mulheres, e em reduzir os danos no DNA tanto do grupo total quanto de ambos os sexos.
- 4- A proteção fornecida pelo óleo de pequi contra danos nos tecidos (avaliados por TGO) e no DNA foi mais eficiente para grupos mais jovens e para a distância percorrida de até 10 Km, indicando que corridas de longas distâncias podem ser prejudiciais, principalmente para atletas mais velhos, devido ao aumento do estresse oxidativo acima da capacidade de adaptação do organismo, mesmo com o uso de suplementos antioxidantes.
- 5- Para TGO, TGP e teste do cometa, houve influência dos genótipos Mn-SOD (polimorfismo –Val9Ala na sequência-sinal mitocondrial) na resposta dos atletas à suplementação com óleo de pequi. A frequência mais alta de heterozigotos foi relacionada a menores danos no DNA e nos tecidos, além de exibirem melhor resposta ao óleo de pequi, com redução significativa de danos.
- 6- Para CPK e PCR-US, os resultados indicaram que o sexo exerceu efeito significativo, e, após o tratamento com pequi, uma queda não-significativa nos valores foi observada apenas para o sexo masculino.
- 7- A tendência geral de redução de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito após o tratamento com pequi foi particularmente associada a uma maior expansão do plasma, sendo tais resultados influenciados por sexo, idade (eritrócitos, hemoglobina) e genótipos de haptoglobina (eritrócitos, hemoglobina e hematócrito), Mn-SOD (hematócrito), CAT (hemoglobina e hematócrito) e GPX1 (hemoglobina).

- 8- A queda significativa nos valores de RDW (amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos; do inglês *Red Cell Distribution Width*) foi relacionada principalmente ao efeito protetor antioxidante do óleo de pequi.
- 9- Os resultados do leucograma e da série plaquetária indicaram que o óleo de pequi foi biologicamente eficiente em reduzir a inflamação provocada pelo exercício agudo.
- 10- A queda significativa nos valores da pressão arterial, de colesterol total e LDL pós-prandiais observada no grupo ≥ 45 anos, sugeriu que o óleo de pequi apresentou efeitos cardiovasculares protetores, principalmente para aqueles atletas incluídos na faixa etária de maior risco. Entretanto esses dados não podem ser extrapolados para indivíduos sedentários ou mesmo para a lipemia após jejum, uma vez que nenhum experimento a respeito foi realizado.
- 11- A tendência de aumento de HDL observada após o tratamento com óleo de pequi foi relacionada a sexo, idade, distância percorrida e genótipos CAT e Hp, sendo que apenas Hp1F-1F apresentou aumento significativo após o tratamento, não havendo alteração significativa nesses valores para nenhum genótipo CAT.
- 12- Para os homens, o teste TBARS apresentou resultados contrários aos obtidos com camundongos e nenhum efeito foi observado nas mulheres, sendo tais resultados influenciados por idade, distância percorrida e genótipos Hp e Mn-SOD.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O óleo de pequi, além de possuir várias propriedades nutricionais, apresentou efeitos antioxidantes e cardiovasculares protetores e, após testes adicionais e com a definição da dose adequada, também poderá ser usado como adjuvante na quimioterapia do câncer, na forma de suplemento alimentar.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMSON, J. L.; HOOPER, W. C.; JONES, D. P.; ASHFAQ, S.; RHODES, S. D.; WEINTRAUB, W. S.; HARRISON, D. G.; QUYYUMI, A. A.; VACCARINO, V. (2005). Association between novel oxidative stress markers and C-reactive protein among adults without clinical coronary heart disease. *Atherosclerosis* **178**: 115-121.
- AGARWAL, M. M.; ANKRA-BADU, G. A. (1999). Serum creatine kinase: a marker for muscle damage in sickle cell painful crisis. *Ann. Saudi Med.* **19**(3): 264-266.
- AHN, J.; GAMMON, M. D.; SANTELLA, R. M.; GAUDET MM, BRITTON JA, TEITELBAUM SL, TERRY MB, NOWELL S, DAVIS, W.; GARZA, C.; NEUGUT, A. I.; AMBROSONE, C. B. (2005). Associations between Breast Cancer Risk and the Catalase Genotype, Fruit and Vegetable Consumption, and Supplement Use. *Am. J. Epidemiol.* **162**(10): 943-952.
- AKYOL, O.; CANATAN, H.; YILMAZ, H. R.; YUCE, H.; OZYURT, H.; SOGUT, S.; GULEC, M.; ELYAS, H. (2004). PCR/RFLP based cost- effective identification of SOD2 signal (leader) sequence polymorphism (Ala-9Val) using NgoMIV: a detailed methodological approach. *Clin. Chim. Acta* **345**: 151-159.
- AKYOL, O.; YANIK, M.; ELYAS, H.; NAMLI, M.; CANATAN, H.; AKIN, H.; YUCE, H.; YILMAZ, H. R.; TUTKUN, H.; SOGUT, S.; HERKEN, H.; ÖZYURT, H.; SAVAS, H. A.; ZORUGLU, S. S. (2005). Association between Ala-9-Val polymorphism of Mn-SOD gene and schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **29**: 123-131.
- ALESSIO, H. M.; HAGERMAN, A. E.; ROMANELLO, M.; CARANDO, S.; THRELKELD, M. S.; ROGERS, J.; DIMITROVA, Y.; MUHAMMED, S.; WILEY, R. L. (2002). Consumption of green tea protects rats from exercise-induced oxidative stress in kidney and liver. *Nutr. Res.* **22**: 1177-1188.
- ALMEIDA, S. P. (1998). Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. Cerrado: Ambiente e Flora. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, p. 247-285.
- ALMEIDA, S. P.; COSTA, T. S. A.; SILVA, J. A. (2008). Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Ed.). Cerrado: Ecologia e Flora – Volume 1. Brasília, DF: EMBRAPA CERRADOS, p. 351-381.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. (1998). Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 464 p.
- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. (1994). Piqui e Buriti - Importância alimentar para a população dos Cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 38p.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. (2005). Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim. Nova* **28**(1): 118-129.
- ALMERSJÖ, O.; BENGMARK, S.; ENGEVIK, L.; HAFSTRÖM, L. O.; LOUGHRIDGE, B. P.; NILSSON, L. A. (1968). Serum enzyme changes after hepatic dearterialization in man. *Ann. Surg.* **167**(1): 9-17.
- AMBROSONE, C. B.; FREUDENHEIM, J. L.; THOMPSON, P. A.; BOWMAN, E.; VENA, J. E.; MARSHALL, J. R.; GRAHAM, S.; LAUGHLIN, R.; NEMOTO, T.; SHIELDS, P. G. (1999). Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Genetic Polymorphisms, Dietary Antioxidants, and Risk of Breast Cancer. *Cancer Res.* **59**: 602-606.
- ANDERSON, D.; BISHOP, J. B.; GARNER, R. C.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; SELBY, P. B. (1995). Cyclophosphamide: review of its Mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mut. Res.* **330**: 115-181.
- ANDERSON, R. A.; EVANS, M. L.; ELLIS, G. R.; GRAHAM, J.; MORRIS, K.; JACKSON, S. K.; LEWIS, M. J.; REES, A.; FRENNEAUX, M. P. (2001). The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* **154**: 475-483.
- ANDRADE-JÚNIOR, D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. (2005). Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J. Bras. Pneumol.* **31**(1): 60-68.
- ANTUNES, L. M.; TAKAHASHI, C. S. (1999). Protection and induction of chromosomal damage by vitamin C in human lymphocytes cultures. *Teratog Carcinog Mutagen.* **19**: 53-59.

- APPLE, F. S.; HELISTEN, Y.; CLARKSON, P. M. (1988). Early detection of skeletal muscle injury by assay of creatine kinase MM isoforms in serum after acute exercise. *Clin. Chem.* **34**(6): 1102-1104.
- ARAÚJO, F. D. (1995). A review of *Caryocar Brasiliense* (Caryocaraceae) - An economically valuable species of the Central Brazilian Cerrado. *Econ. Bot.* **49**(1): 40-48.
- ARMSTRONG, R. B.; OGILVIE, R. W.; SCHWANE, J. A. (1983). Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **54**: 80-93.
- ASLEH, R.; MILLER-LOTAN, R.; AVIRAM, M.; HAYEK, T.; YULISH, M.; LEVY, J. E.; MILLER, B.; BLUM, S.; MILMAN, U.; SHAPIRA, C.; LEVY, A. P. (2006). Haptoglobin Genotype Is a Regulator of Reverse Cholesterol Transport in Diabetes In Vitro and In Vivo. *Circ. Res.* **99**: 1419-1425.
- AWADALLAH, S. M. (2003). Haptoglobin 2-2 phenotype is associated with decreased ferroxidase activity in smokers. *Clin. Chim. Acta* **334**: 71-76.
- AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (2004). Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *J. Food Compos. Anal.* **17**: 385-396.
- BANERJEE, B. D.; SETH, V.; AHMED, R. S. (2001). Pesticide induced oxidative stress: perspective and trends. *Rev. Environ. Health* **16**:1-15.
- BARBOSA, R. C. M. V.; AMANTE, E. R. Farinha da Casca de Pequi (*Caryocar brasiliense*). Disponível em: <http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/tecnologia_de_alimentos/015.htm> Acesso em 29/10/2005.
- BARBOSA, T. M.; MAGALHÃES, P. M.; LOPES, V. P.; NEUPARTH, M.; DUARTE, J. A. (2003). Comparação da variação da actividade neuromuscular, da creatina quinase e da força isométrica máxima voluntária entre dois protocolos exaustivos e inabituais. *Rev. Port. Cien. Desp.* **3**(1):7-15.
- BARREIROS, A. L. B. S.; M. DAVID, J. M.; DAVID, J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova* **29**(1): 113-123.
- BASTAKI, M.; HUEN, K.; MANZANILLO, P.; CHANDE, N.; CHEN, C.; BALMES, J. R.; TAGER, I. B.; HOLLAND, N. (2006). Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenetics Genom.* **16**(4): 279-286.
- BATELLO, C. F. (2002). Efeito antioxidante *in vitro* dos medicamentos homeopáticos *Arsenicum album*, *Cuprum metallicum*, *Manganum* e *Zincum metallicum*. 2002. Dissertação (Mestrado em Homeopatia) – Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo (FACIS) – Centro de ensino superior em homeopatia (IBEHE), São Paulo. Disponível em: <<http://www.homeoint.org/portugues/batello/portugues.htm>> Acesso em 15/10/2005.
- BEJMA J.; RAMIRES, P.; JI, L. (2000). Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiol. Scand.* **169**(4): 343-351.
- BELARDINELLI, R. (2007). Exercise Training in Chronic Heart Failure - How to Harmonize Oxidative Stress, Sympathetic Outflow, and Angiotensin II. *Circulation* **115**: 3042-3044.
- BELVIRANLI, M.; GÖKBEL, H. (2006). Acute exercise induced oxidative stress and antioxidant changes. *Eur. J. Gen. Med.* **3**(3): 126-131.
- BERGER, M. M. (2005). Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin. Nutr.* **24**: 172-183.
- BERNARD, D.; CHRISTOPHE, A.; DELANGHE, J.; LANGLOIS, M.; DE BUYZERE, M.; COMHAIRE, F. (2002). The effect of supplementation with an antioxidant preparation on LDL-oxidation is determined by haptoglobin polymorphism. *Redox Rep.* **7**(6): 1-5.
- BHATTACHARYA, K.; YADAVA, S.; PAPP, T.; SCHIFFMANN, D.; RAHMAN, Q. (2004). Reduction of chrysotile asbestos-induced genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes by garlic extract. *Toxicol. Letters* **153**: 327-332.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.* **12**(2): 123-130.
- BICA, C. G.; CRUZ, I. B. M.; SILVA, L. L. M.; TOSCANI, N. V.; ZETTLER, C. G.; GRAUDENZ, M. S. (2007). Association of manganese superoxide dismutase gene polymorphism (Ala-9Val) and breast cancer in males and females. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **43**(3): 219-225.
- BOLETIM INFORMATIVO UFMG Nº 1511 (01/12/2005). Os frutos da genética. Disponível em <<http://www.ufmg.br/boletim/bol1511/sexta.shtml>> Acesso em 31/05/2007.
- BOREK, C. (2004). Dietary Antioxidants and Human Cancer. *Integr. Cancer Ther.* **3**(4): 333-341.

- BORRESEN, A. L.; LEREN, T.; BERG, K.; SOLAAS, M. H. (1987). Effect of Haptoglobin Subtypes on Serum Lipid Levels. *Hum. Hered.* **37**(3): 150-156.
- BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. (2005). The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* **20**(4): 245-254.
- BROUWERS, A.; LANGLOIS, M.; DELANGHE, J.; BILLIET, J.; BUZYERE, M. D.; VERCAEMST, R.; RIETZCHEL, E.; BERNARD, D.; BLATON, V. (2004). Oxidized low-density lipoprotein, iron stores, and haptoglobin polymorphism. *Atherosclerosis* **176**: 189-195.
- BRUCE, R.; TODD, J. K.; LE DUNE, L. (1958). Serum Transaminase: Its Clinical Use in Diagnosis and Prognosis. *Br. Med. J.* **2**(5105):1125-1128.
- CAI, Q.; SHU, X. O.; WEN, W.; CHENG, J. R.; DAI, Q.; GAO, Y. T.; ZHENG, W. (2004). Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene, antioxidant intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Breast Cancer Res.* **6**: R647-R655.
- CAMPOS, E. B. P.; YOSHIDA, W. B. (2004). O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. *J. Vasc. Br.* **3**(4): 357-366.
- CANO, A.; ACOSTA, M.; ARNAO, M. B. (2003). Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity changes during on-vine ripening of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Post. Biol. Technol.* **28**:59-65.
- CARLSON, D. L.; MAWDSLEY, R. H. (1986). Sports anemia: A review of the literature. *Am. J. Sports Med.* **14**(2): 109-112.
- CARNEVALI, S.; PETRUZZELLI, S.; LONGONI, B.; VANACORE, R.; BARALE, R.; CIPOLLINI, M.; SCATENA, F.; PAGGIARO, P.; CELI, A.; GIUNTINI, C. (2003). Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **284**: L955-L963.
- CARTER K, WORWOOD M. (2007). Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int. J. Lab. Hem.* **29**, 92-110.
- CARVALHO-SILVA, D. R.; SANTOS, F. R.; ROCHA, J.; PENA, S. D. J. (2001). The Phylogeography of Brazilian Y-Chromosome Lineages. *Am. J. Hum. Genet.* **68**:281-286.
- CASELLA FILHO, A.; ARAÚJO, R. G.; GALVÃO, T. G.; CHAGAS, A. C. P. (2003). Inflamação e Aterosclerose: Integração de Novas Teorias e Valorização dos Novos Marcadores. *Rev. Bras. Cardiol. Invas.* **11**(3): 14-19.
- CAZZOLA R, RUSSO-VOLPE S, CERVATO G, CESTARO B. (2003). Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur. J. Clin. Invest.* **33**: 924-930.
- CEMELI, E.; BAUMGARTNER, A.; ANDERSON, D. (2009). Antioxidants and the Comet assay. *Mutat. Res.* **681**(1): 51-67.
- CHALIFOUX, A.; LAGACÉ, A. (1969). Enzymes Sériques pour le Diagnostic de la Nécrose Hépatique Aigüe Expérimentale. *Can. J. Comp. Med.* **33**(3): 178-186.
- CHEN, C. J.; BROWN-BORG, H. M.; RAKOCZY, S. G.; THOMPSON, L. V. (2008). Muscle Disuse: Adaptation of Antioxidant Systems Is Age Dependent. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **63A**(5): 461-466.
- CHOI, J. Y.; NEUHOUSER, M. L.; BARNETT, M. J.; HONG, C. C.; KRISTAL, A. R.; THORNQUIST, M. D.; KING, I. B.; GOODMAN, G. E.; AMBROSONE, C. B. (2008). Iron intake, oxidative stress-related genes (MnSOD and MPO) and prostate cancer risk in CARET cohort. *Carcinogenesis* **29**(5): 964-970.
- CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am. J. Clin. Nutr.* **72**(suppl): 637S-46S.
- COELHO, C.; GUERRA, A.; REGO, C.; BREITENFELD, L.; CASTRO, E.; RODRIGUES, P.; LAIRES, M. J.; BICHO, M. (2006). Polimorfismos Genéticos da Enzima Conversora da Angiotensina-I (ECA), Haptoglobina (HP) e Angiotensinogénio (AGT) e Parâmetros de Sobrecarga Oxidante, em Adolescentes de 12-15 Anos de Idade. *Rev. Port. Cardiol.* **25**(7-8): 677-690.
- COLLINS, A.R. (2001). Carotenoids and genomic stability. *Mutat. Res.* **475**: 21-28.
- COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *FASEB J.* **17**: 1195-1214.
- CRUZAT, VF; ROGERO, MM; BORGES, MC; TIRAPEGUI, J. (2007). Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Rev. Bras. Med. Esp.* **13**(5): 336-342.

- CULLEN, P. (2000). Evidence that triglycerides are an independent coronary Heart disease risk factor. *Am. J. Cardiol.* **86**(9): 943-949.
- DE PAZ, J. A.; VILLA, J. G.; LOPEZ, P.; GONZALEZ-GALLEGO, J. (1995). Effects of long-distance running on serum bilirubin. *Med. Sci. Sports Exerc.* **27**(12): 1590-1594
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. (2004). Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Vis. Acad.* **5**: 33-40.
- DELANGHE, J.; LANGLOIS, M.; DE BUYZERE, M. (1998). Congenital Anhaptoglobinemia Versus Acquired Hypohaptoglobinemia. *Blood* **91**(9): 3524.
- DEMIRBAG, R.; YILMAZ, R.; GÜZEL, S.; ÇELİK, H.; KOÇYIGIT, A.; ÖZCAN, E. (2006). Effects of treadmill exercise test on oxidative/antioxidative parameters and DNA damage. *Anadolu Kardiyol. Derg.* **6**: 135-40.
- DEWAR, H. A.; ROWELL, N. R.; SMITH, A. J. (1958). Serum glutamic oxalacetic transaminase in acute myocardial infarction. *Brit Med* **2**(5105):1121-1125.
- DIZDAROGLU, M. (1992). Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat. Res.* **275**: 331-342.
- DUMMER, C. D. THOMÉ, F. S.; VERONESE, F. V. (2007). Doença renal crônica, inflamação e aterosclerose: novos conceitos de um velho problema. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **53**(5): 446-50.
- DUSINSKÁ, M.; KASIMIROVÁ, A.; BARANCOKOVÁ, M.; BENO, M.; SMOTKOVA, B.; HORSKÁ, A.; WSOLOVA, J. L.; COLLINS, A. R. (2003). Nutricional supplementation with antioxidants decreases chromosomal damage in humans. *Mutagenesis* **18**: 371-376.
- EICHNER, E. R. (1992). Sports anemia, iron supplementation, and blood doping. *Med. Sci. Sports Exerc.* **24**(9): S315-S318.
- EICHNER, E. R. (1996). "Anemia do Esportista": Terminologia Inadequada Para Um Fenômeno Real. Sports Science Exchange. Gatorade Sports Science Institute (GSSI), Sports Science Exchange 08 - Novembro/Dezembro - 1996. Disponível em: <<http://www.gssi.com.br/publicacoes/sse/pdf/gatoradesse8.pdf>> Acesso em 10/01/2009.
- EICHNER, E. R. (1998). Sports Anemia. In: Safran, M. R.; McKeag, D.; Van Camp, S. P. (Eds). Manual of Sports Medicine. Lippincott Williams & Wilkins. p 255-259.
- EICHNER, E. R. (2002). Anemia e formação de sangue (hematopoiese). Gatorade Sports Science Institute (GSSI), Sports Science Exchange 32 - Janeiro/Fevereiro/Março - 2002. Disponível em <http://www.gssi.com.br/scripts/publicacoes/sse/sse_artigo.asp?IDTipo=1&IDPublicacao=37&DscArquivo=gatoradesse32.pdf&DscArquivoHtm=/SSE/Html/32.htm> Acesso em 10/01/2009.
- EMBRAPA CERRADOS (2003). Conhecer e aproveitar a flora nativa. Disponível em <<http://www.cpac.embrapa.br/tecnologias/floranativa.html>> Acesso em 01/06/2007.
- EMBRAPA: Cerrado - Pequi poderá ser explorado comercialmente (19/10/2004). Disponível em: <http://www21.sede.embrapa.br/linhas_de_acao/ecossistemas/cerrado/cerrado_6/mostra_documento> Acesso em 29/10/2005.
- EREXSON, G. L.; BRYANT, M. F.; KWANYUEN, P.; KLIGERMAN, A. D. (1995). Bleomycin sulfate-induced micronuclei in human, rat and mouse peripheral blood lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* **25**: 31-36.
- FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L. A. G. (1998). Modificação por via enzimática da composição triglicerídica do óleo de piqui (*Caryocar brasiliense* Camb). *Quim. Nova* **21**(1): 16-19.
- FALLON, K E; SIVYER, G ; SIVYER, K; DARE, A. (1999). Changes in haematological parameters and iron metabolism associated with a 1600 kilometre Ultramarathon. *Br. J. Sports Med.* **33**:27-32
- FDA (U.S. Food and Drug Administration). (2000). Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. Redbook 2000: IV.C.1.d. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov/~redbook/redivc1d.html>> Acesso em 16/06/2007.
- FEKSA, L. R.; LUCHESE, M. D.; FREZZA, R. B.; OLIVEIRA, E.; BISI, S. L.; MOREIRA, M. C.; BENETTI, E.; TROMBINI, T.; BERLEZE, D. B. (2008). Exercício intenso e intoxicação pelo chumbo podem gerar estresse oxidativo e prejuízo à saúde humana. *Lecturas: EF & Deportes. Revista Digital - Buenos Aires - Ano 12 - N° 117*. Disponível em <http://www.efdeportes.com/efd117/ejercicio-intenso-e-intoxicacao-pelo-chumbo.htm>. Acesso em 08/10/2008.

- FERREIRA F.; FERREIRA, R.; DUARTE, J. A. (2007). Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Rev. Port. Cien. Desp.* **7**(2): 257–275.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **43**(1): 61-68.
- FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. (2006). Oxidative Stress: Relationship with Exercise and Training. *Sports Med.* **36**(4): 327-358.
- FLEKAC, M.; SKRHA, J.; HILGERTOVA, J.; LACINOVA, Z.; JAROLIMKOVA, M. (2008). Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC Med. Genet.* **9**: 30. doi:10.1186/1471-2350-9-30
- FORSBERG, L.; DE FAIRE, U.; MARKLUND, S. L.; ANDERSSON, P. M.; STEGMAYR, B.; MORGENSTERN, R. (2000). Phenotype determination of a common Pro-Leu polymorphism in human glutathione peroxidase 1. *Blood Cells Mol. Dis.* **26**(5): 423– 426.
- FORSBERG, L.; FAIRE, U.; MORGENSTERN, R. (2001). Oxidative Stress, Human Genetic Variation, and Disease. *Arch. Biochem. Biophys.* **389**(1): 84–93. (a)
- FORSBERG, L.; LYRENÄS, L.; FAIRE, U.; MORGENSTERN, R. (2001). A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Rad. Biol. Med.* **30**(5): 500-505. (b)
- FOSCHINI, D.; PRESTES, J.; CHARRO, M. A. (2007). Relação entre exercício físico, dano muscular e dor muscular de início tardio. *Rev. Bras. Cineantropom Desempenho Hum.* **9**(1):101-106.
- FOSTER, C. B.; ASWATH, K.; CHANOCK, S. J.; MCKAY, H. F.; PETERS U. (2006). Polymorphism analysis of six selenoprotein genes: support for a selective sweep at the glutathione peroxidase 1 locus (3p21) in Asian populations. *BMC Genet.* **7**:56. doi:10.1186/1471-2156-7-56.
- FOWKES, F. J. I.; IMRIE, H.; MIGOT-NABIAS, F.; MICHON, P.; JUSTICE, A.; DELORON, P.; LUTY, A. J. F.; DAY, K. P. (2006). Association of haptoglobin levels with age, parasite density, and haptoglobin genotype in a malaria-endemic area of gabon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**(1): 26-30.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* **28**: 1056–1071.
- GASPER, M. C.; GILCHRIST, J. M. (2005). Creatine kinase: a review of its use in the diagnosis of muscle disease. *Med. Health R. I.* **88**(11): 398- 404.
- GAVALAS, N. G.; AKHTAR, S.; GAWKRODGER, D. J.; WATSON, P. F.; WEETMAN, A. P.; KEMP, E. H. (2006). Analysis of allelic variants in the catalase gene in patients with the skin depigmenting disorder vitiligo. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **345**:1586–1591.
- GIBALA, M. J.; MACDOUGALL, J. D.; TARNOPOLSKY, M. A.; STAUBER, W. T.; ELORRIAGA, A. (1995). Changes in human skeletal muscle ultrastructure and force production after acute resistance exercise. *J Appl Physiol.* **78**: 702–708.
- GOMES, M. M.; SAUNDERS, C. ; ACCIOLY, E. (2005). Papel da vitamina A na prevenção do estresse oxidativo em recém-nascidos. *Rev. Bras. Saúde Mater. Infant.* **5**(3): 275-282.
- GOMEZ-CABRERA, M. C.; VIÑA, J.; DOMÉNECH, E. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Rad. Biol. Med.* **44**: 126–131.
- GÓTH L. (1998). Genetic heterogeneity of the 5' uncoding region of the catalase gene in Hungarian acatalasemic and hypocatalasemic subjects. *Clin. Chim. Acta* **271**: 73–78.
- GÓTH, L. (2001). A New Type of Inherited Catalase Deficiencies: Its Characterization and Comparison to the Japanese and Swiss Type of Acatalasemia. *Blood Cells Mol. Dis.* **27**(2): 512–517.
- GÓTH, L.; RASS, P.; PÁY, A. (2004). Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol. Diagn.* **8**(3):141-9.
- GÓTH, L.; VITAI, M. (1997). Polymorphism of 5' of the catalase gene in Hungarian acatalasemia and hypocatalasemia. *Electrophoresis* **18**: 1105-1108.
- GRASBON-FRODL, E. M.; KÖSEL, S.; RIESS, O.; MÜLLER, U.; MEHRAEIN, P.; GRAEBER, M. B. (1999). Analysis of Mitochondrial Targeting Sequence and Coding Region Polymorphisms of the Manganese Superoxide Dismutase Gene in German Parkinson Disease Patients. *Biochem Biophys Res. Commun.* **255**: 749–752.
- GRIFFITHS, P. D. (1964). Serum levels of creatine phosphokinase. *J. Clin. Path.* **17**: 56-57.

- GUARNIERI, S.; RISO, P.; PORRINI, M. (2007). Orange juice vs vitamin C: effect on hydrogen peroxide-induced DNA damage in mononuclear blood cells. *Br. J. Nutr.* **97**:639-643.
- GUÉYE, P. M.; GLASSER, N.; FÉRARD, G.; LESSINGER, J. M. (2006). Influence of human haptoglobin polymorphism on oxidative stress induced by free hemoglobin on red blood cells. *Clin. Chem. Lab. Med.* **44**(5):542-547.
- HARDMAN, A. E. (1998). The influence of exercise on postprandial triacylglycerol metabolism. *Atherosclerosis* **141**(1): S93-S100.
- HARMAN D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**: 298-300.
- HASSETT, D. J.; IMLAY, J. A. (2007). Bactericidal Antibiotics and Oxidative Stress: A Radical Proposal. *ACS Chem. Biol.* **2** (11): 708-710.
- HECHT, S. M. (2000). Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action. *J. Nat. Prod.* **63**: 158-168.
- HENDERSON, L.; WOLFREYS, A.; FEDYK, J.; BOURNER, C.; WINDEBANK, S. (1998). The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis* **13**: 89-94.
- HERCBERG, S.; CZERNICHOW, S.; GALAN, P. (2006). Antioxidant vitamins and minerals in prevention of cancers: lessons from the SU.VI.MAX study. *Br. J. Nutr.* **96**(1): S28-S30.
- HERCBERG, S.; GALAN, P.; PREZIOSI, P.; ALFAREZ, M. J.; VAZQUEZ, C. (1998). The potential role of antioxidant vitamins in preventing cancers. *Nutrition* **15**: 513-520.
- HERMES-LIMA, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: STOREY, K. B. (Org) *Funcional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Hoboken, New Jersey, pp. 319-368.
- HEYDEN, S. (1994). Polyunsaturated and monounsaturated fatty acids in the diet to prevent coronary heart disease via cholesterol reduction. *Ann. Nutr. Metab.* **38**:117-122.
- HOFFMANN, G. R.; COLYER, S. P.; LITTLEFIELD, G. (1993). Induction of micronuclei by bleomycin in G0 human lymphocytes: I. Dose-response and distribution. *Environ. Mol. Mutagen.* **21**: 130-135.
- HU, Y. J.; DIAMOND, A. M. (2003). Role of Glutathione Peroxidase 1. In: *Breast Cancer: Loss of Heterozygosity and Allelic Differences in the Response to Selenium*. *Cancer Res.* **63**: 3347-3351.
- IARC. (1981). Some antineoplastic and immunosuppressive agents. In: *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to humans*. *IARC* **26**: 165-202.
- ICHIMURA, Y.; HABUCHI, T.; TSUCHIYA, N.; LIZHONG, W.; OYAMA, C.; SATO, K.; NISHIYAMA, H.; OGAWA, O.; KATO, T. (2004). Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. *J. Urol.* **172**: 728-732, 2004.
- IMLAY, J. A.; LINN, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, **340**: 1302- 1308.
- JALOSZYŃSKI, P.; KUJAWSKI, M.; CZUB-SWIERCZEK, M.; MARKOWSKA, J.; SZYFTER, K. (1997). Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. *Mutation Res.* **385**: 223-233.
- JANAYDEH, M.; HAMAD, M.; AWADALLAH, S. (2004). The relationship between haptoglobin polymorphism and serum ceruloplasmin ferroxidase activity. *Clin. Exp. Med.* **3**: 219-223.
- JANERO, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* **9**(6): 515-540.
- JENTZSCH, A. M.; BACHMANN, H.; FURST, P.; BIESALSKI, H. K. (1996). Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Rad. Biol. Med.* **20**(2): 251-256.
- JI, L. L. (1995). Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic. Biol. Med.* **18**(6):1079-1086.
- JI, L. L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **222**: 283-292.
- JI, L. L.; FU, R. (1992). Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J. Appl. Physiol.* **72**: 549-554.
- JI, L. L.; LEICHTWEIS, S. (1997). Exercise and oxidative stress: sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. *Age* **20**: 91-106.
- JI, L. L.; RADAK, Z.; GOTO, S. (2008) Hormesis and Exercise: How the Cell Copes with Oxidative Stress. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* **3**(1): 41-55.
- JOHNATTY, S. E.; NAGLE, C. M.; SPURDLE, A. B.; CHEN, X.; AUSTRALIAN BREAST CANCER FAMILY STUDY; WEBB, P. M.; CHENEVIX-TRENCH, G. (2007). The MnSOD Val9Ala polymorphism, dietary antioxidant. *Gynecol. Oncol.* **107**(3): 388-391.

- JOSEPHY, P. D.; MANNERVIK, B.; MONTELLANO, P. D. (1997). Molecular Toxicology, In: Oxidative stress in the erythrocytes. *Oxford University Press*, pp. 105-123.
- JUDGE, S.; LEEUWENBURGH, C. (2007). Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress, and aging. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**:1983-1992.
- KANTER, M. M.; NOLTE, L. A.; HOLLOSZY, J. O. (1993). Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J. Appl. Physiol.* **74**: 965-9.
- KASAP, S.; GÖNENÇ, A.; ŞENER, D. E.; HISAR, I. (2007). Serum Cardiac Markers in Patients with Acute Myocardial Infarction: Oxidative Stress, C-Reactive Protein and N-Terminal Probrain Natriuretic Peptide. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **41**: 50-57.
- KHOURI, J.; RESCK, I. S.; POÇAS-FONSECA, M.; SOUZA, T. M. M.; PEREIRA, L. O.; OLIVEIRA, A. B. B.; GRISOLIA, C. K. (2007). Anticlastogenic potential and antioxidant effects of the aqueous extract of pulp from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). *Genet. Mol. Biol.* **30**(2): 442-448.
- KIECHL, S.; WILLEIT, J.; MAYR, M.; VIEHWEIDER, B.; OBERHOLLENZER, M.; KRONENBERG, F.; WIEDERMANN, C. J.; OBERTHALER, S.; XU, Q.; WITZTUM, J. L.; TSIMIKAS, S. (2007). Oxidized Phospholipids, Lipoprotein(a), Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity, and 10-Year Cardiovascular Outcomes. *Thromb. Vasc. Biol.* **27**: 1788-1795.
- KIM, H. J.; LEE, Y. H.; KIM, C. K. (2007). Biomarkers of muscle and cartilage damage and inflammation during a 200 km run. *Eur. J. Appl. Physiol.* **99**: 443-447.
- KIMURA, K.; ISASHIKI, Y.; SONODA, S.; KAKIUCHI-MATSUMOTO, T.; OHBA, N. (2000). Genetic association of manganese superoxide dismutase with exudative age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* **130**(6): 769-773.
- KINNULA, V. L.; LEHTONEN, S.; KOISTINEN, P.; KAKKO, S.; SAVOLAINEN, M.; KERE, J.; OLLIKAINEN, V.; LAITINEN, T. (2004). Two functional variants of the superoxide dismutase genes in Finnish families with asthma. *Thorax* **59**: 116-119.
- KISHIMOTO, Y.; MURAKAMI, Y.; HAYASHI, K.; TAKAHARA, S.; SUGIMURA, T.; SEKIYA, T. (1992). Detection of a common mutation of the catalase gene in Japanese acatalasemic patients. *Hum. Genet.* **88**: 487-490.
- KLAPCIŃSKA, B.; JAGSZ, S.; SADOWSKA-KREPA, E.; GÓRSKI, J.; KEMPA, K.; LANGFORT, J. (2008). Effects of Castration and Testosterone Replacement on the Antioxidant Defense System in Rat Left Ventricle. *J. Physiol. Sci.* **58**(3): 173-177.
- KNIGHT, J.A.; ONAY, U.V.; WELLS, S.; LI, H.; SHI, E. J. Q.; ANDRULIS, IL.; OZCELIK, H. (2004). Genetic Variants of GPX1 and SOD2 and Breast Cancer Risk at the Ontario Site of the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **13**: 146-149.
- KOCH, W.; LATZ, W.; EICHINGER, M.; GSCHWENDNER, C.; TEIGE, B.; SCHÖMIG, A.; KASTRATI, A. (2003). Haptoglobin Gene Subtyping Restriction Enzyme Analysis. *Clin. Chemistry* **49**(11): 1937-1940.
- KODA, Y.; SOEJIMA, M.; YOSHIOKA, N.; KIMURA, H. (1998). The haptoglobin-gene deletion responsible for anhaploglobinemia. *Am. J. Hum. Genet.* **62**(20): 245-252. (Abstract).
- KODA, Y.; WATANABE, Y.; SOEJIMA, M.; SHIMADA, E.; NISHIMURA, M.; MORISHITA, K.; MORIYA, S.; MITSUNAGA, S.; TADOKORO, K.; KIMURA, H. (2000). Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in anhaploglobinemic patients with antihaptoglobin antibody that causes anaphylactic transfusion reactions. *Blood* **95**(4): 1138- 1143.
- KONG, Q.; LILLEHEI, K.O. (1998). Antioxidant inhibitors for cancer therapy. *Med. Hypotheses* **51**:405-409.
- KRISHNA, G.; NATH, J.; PETERSON, M.; ONG, T. (1987). Cyclophosphamide-induced cytogenetic effects in mouse bone marrow and spleen cells in vivo and in vivo/in vitro assays. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **7**: 183-195.
- KRÜGER, A.; PÜSCHEL, K. (1993). Haptoglobin subtypes in Northern Germany (Hamburg). *Int. J. Legal Med.* **106**(1): 53-54.
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. (2006). Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciênc. Rural* **36**(4): 1283-1287.
- LAC, G.; MASO, F. (2004). Biological markers for the follow-up of athletes throughout the training season. *Pathol. Biol.* **52**(1): 43-9.
- LAI, L. Y.; CONSTANS, J.; ARCHER, G. T. (1986). Isoelectric focusing studies of transferrin and haptoglobin subtypes in an Australian white population. *Ann. Hum. Biol.* **13**(6): 555-61.
- LAMARÃO, R. C.; NAVARRO, F. (2007). Aspectos nutricionais promotores e protetores das doenças cardiovasculares. *Rev. Brasil. Obes. Nutri. Emagrec.* **1**(4): 57-70.

- LANGLOIS, M. R.; BUYZERE, M. L. D.; VAN VLIERBERGHE, H.; DELANGHE, J. R. (2004). Haptoglobin polymorphism and serum ferritin concentration in ageing subject. *Br. J. Haematol.* **124**(4): 555-563.
- LANGLOIS, M. R.; DELANGHE, J. R. (1996). Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin. Chem.* **42**(10): 1589-1600.
- LANGLOIS, M. R.; DELANGHE, J. R.; DE BUYZERE, M. L.; BERNARD, D. R.; OUYANG, J. (1997). Effect of haptoglobin on the metabolism of vitamin C1-3. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**: 606-610.
- LANGLOIS, M. R.; MARTIN, M. E.; BOELAERT, J. R.; BEAUMONT, C.; TAES, Y. E.; DE BUYZERE, M. L.; BERNARD, D. R.; NEELS, H. M.; DELANGHE, J. R. (2000). The Haptoglobin 2-2 Phenotype Affects Serum Markers of Iron Status in Healthy Males. *Clin. Chem.* **46**(10): 1619-1625.
- LAUFS, U.; WASSMANN, S.; CZECH, T.; MÜNZEL, T.; EISENHAUER, M.; BÖHM, M.; NICKENIG, G. (2005). Physical Inactivity Increases Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction, and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**: 809-814.
- LECARPENTIER Y. (2007). Physiological role of free radicals in skeletal muscles. *J. Appl. Physiol.* **103**:1917-1918.
- LEE, J. H.; PARK, R. Y.; LEE, C. S.; JEOUNG, E. J.; NAM, S. Y.; LEE, J. G.; HAN, K. Y.; LEE, H. J.; CHUNG, J. H.; AHN, Y. G.; YIM, S. V.; CHO, J.; PARK, Y. H. (2002). No Association between Catalase Gene Polymorphism and Gastric Carcinoma and Hepatocellular Carcinoma in Koreans. *Cancer Res. Treat.* **34**(6): 432-435.
- LEE, P. J.; MIN, B. S.; NA, R. B.; NA, M. K.; LEE, S. M.; LEE, H. K.; KIM, J. G.; BAE, K. H.; KANG, S. S. (2003). Stilbenes from the roots of *Pleuropterus ciliinervis* and their antioxidant activities. *Phytochem.* **64**:759-763.
- LEE, S. K.; KADER, A. A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Technol.* **20**: 207-220.
- LEEUWENBURGH, C.; FIEBIG, R.; CHANDWANEY, R.; JI, L. L. (1994). Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am. J. Physiol.* **267**: R439-R445.
- LEVY, A. P. (2004). Haptoglobin: A Major Susceptibility Gene for Diabetic Cardiovascular Disease. *IMAJ* **6**: 308-310.
- LEVY, A. P.; HOCHBERG, I.; JABLONSKI, K.; RESNICK, H.; BEST, L.; LEE, E. T.; HOWARD, B. V. (2002). Haptoglobin phenotype and the risk of cardiovascular disease in individuals with diabetes: The Strong Heart Study. *J. Am. Coll. Card.* **40**:1984-1990.
- LEVY, A. P.; LARSON, M. G.; COREY, D.; LOTAN, R.; VITA, J. A.; BENJAMIN, E. J. (2004). Haptoglobin phenotype and prevalent coronary heart disease in the Framingham offspring cohort. *Atherosclerosis* **172**: 361-365.
- LIGHTFOOT, T. J.; SKIBOLA, C. F.; SMITH, A. G.; FORREST, M. S.; ADAMSON, P. J.; MORGAN, G. J.; BRACCI, P. M.; ROMAN, E.; SMITH, M. T.; HOLLY, E. A. (2006). Polymorphisms in the oxidative stress genes, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* **91**: 1222-1227.
- LIMA, A.; SILVA, A. M. O.; TRINDADE, R. A.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. (2007). Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). *Rev. Bras. Frutic.* **29**(3): 695-698.
- LIU, M. L.; YLITALO, K.; SALONEN, R.; SALONEN, J. T.; TASKINEN, M. R. (2004). Circulating Oxidized Low-Density Lipoprotein and Its Association With Carotid Intima-Media Thickness in Asymptomatic Members of Familial Combined Hyperlipidemia Families. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**: 1492-1497.
- LIU, X.; ZHAO, J.; ZHENG, R. (2003). DNA damage of tumor-associated lymphocytes and total antioxidant capacity in cancerous patients. *Mutat. Res.* **539**: 1-8.
- LÓPEZ, S.; BERMÚDEZ, B.; PACHECO, Y. M.; LÓPEZ-LLUCH, G.; MOREDA, W.; VILLAR, J.; ABIA, R.; MURIANA, F. J. G. (2007). Dietary Oleic and Palmitic Acids Modulate the Ratio of Triacylglycerols to Cholesterol in Postprandial Triacylglycerol-Rich Lipoproteins in Men and Cell Viability and Cycling in Human Monocytes. *J. Nutr.* **137**: 1999-2005.
- LORENZO, J. (2003). A new hypothesis for how sex steroid hormones regulate bone mass. *J. Clin. Invest.* **111**: 1641-1643.

- MAGAUDDA, L.; DI MAURO, D.; TRIMARCHI, F.; ANASTASI, G. (2004). Effects of Physical Exercise on Skeletal Muscle Fiber: Ultrastructural and Molecular Aspects. *Basic Appl. Myol.* **14**(1): 17-21.
- MAGNUSSON, M. K.; SIGFUSSON, N.; SIGVALDASON, H.; JOHANNESSON, G. M.; MAGNUSSON, S.; THORGEIRSSON, G. (1994). Low iron-binding capacity as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation*, **89**: 102-108.
- MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, M. H. L. (2008). Aroma volatiles of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.). *J. Food Compos. Anal.* **21**: 574-576.
- MAK, J. C. W.; LEUNG, H. C. M.; HO, S. P.; KO, F. W. S.; CHEUNG, A. H. K.; IP, M. S.M.; CHAN-YEUNG, M. M. W. (2006). Polymorphisms in manganese superoxide dismutase and catalase genes: functional study in Hong Kong Chinese asthma patients. *Clin. Exp. Allergy* **36**: 440-447.
- MANCHADO, F. B.; CLAUDIO GOBATO, A.; CONTARTEZE, R. V. L.; PAPOTI, M.; MELLO, M. A. R. (2006). Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. *Rev. Bras. Med. Esporte* **12**(5): 259-262.
- MARQUES, M. C. S.; CARDOSO, M. das G.; SOUZA, P. E. de; GAVILANES, M. L.; SOUZA, J. A. de; PEREIRA, N. E.; NEGRÃO, I. O. (2002). Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. *Ciênc. Agrotec. Edição Especial*, p. 1410-1419.
- MARTIN, R. C. G.; LI, Y.; LIU, Q.; JENSEN, N. S.; BARKER, D. F.; DOLL, M. A.; HEIN, D. W. (2009). Manganese superoxide dismutase V16A single-nucleotide polymorphism in the mitochondrial targeting sequence is associated with reduced enzymatic activity in cryopreserved human hepatocytes. *DNA Cell Biol.* **28**(1): 3-7. doi:10.1089/dna.2008.0788.
- MASTALOUDIS, A.; YU, T.W.; O'DONNELL, R. P.; FREI, B.; DASHWOOD, R. H.; TRABER, M. G. (2004). Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Rad. Biol. Med.* **36**(8): 966 – 975.
- MELAMED-FRANK M, LACHE O, ENAV BI, SZAFRANEK T, LEVY NS, RICKLIS RM, LEVY AP. (2001). Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood* **98**(13): 3693-3698.
- MERTENS, A.; HOLVOET, P. (2001). Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J.* **15**: 2073-2084.
- MIRANDA-VILELA, A. L.; AKIMOTO, A. K.; ALVES P. C. Z.; HIRAGI, C. O.; PENALVA, G. C.; OLIVEIRA, S. F.; GRISOLIA, C. K.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M. N. (2009). Haptoglobin gene subtypes in three Brazilian population groups of different ethnicities. *Gen. Mol. Biol.* **in press**.
- MIRANDA-VILELA, A. L.; RESCK, I. S.; GRISOLIA, C. K. (2008). Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. *Gen. Mol. Biol.* **31**(4): 956-963.
- MITKA, M. (2004). Biomarkers for Coronary Heart Disease: Predictive Value or Background Noise? *JAMA* **292**(23): 2824-2825.
- MITRUNEN, K.; SILLANPAA, P.; KATAJA, V.; ESKELINEN, M.; KOSMA, V. M.; BENHAMOU, S.; UUSITUPA, M.; HIRVONEN, A. (2001). Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. *Carcinogenesis* **22**: 827–829.
- MOLAVI, B.; MEHTA, J. L. (2004). Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. *Curr. Opin. Cardiol.* **19**: 488-493.
- MOLLER, P.; LOFT, S.; LUNDBY, C.; OLSEN, N. V. (2001). Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. *The FASEB Journal* **15**: 1181-1186.
- MOOREN, F. C.; BLÖMING, D.; LECHTERMANN, A.; LERCH, M. M.; VÖLKER, K. (2002). Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *J. Appl. Physiol.* **93**: 147-153.
- MOOSMANN, B.; BEHL, C. (1999). The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 8867-8872.

- MOREIRA, L. R. S.; MIRANDA-VILELA, A. L.; SILVA, I. C. R.; AKIMOTO, A. K.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M. N.; GRISOLIA, C. K. (2009). Antioxidant effect of haptoglobin phenotypes against DNA damage induced by hydrogen peroxide in human leukocytes. *Genet. Mol. Res.* **8**(1): 284-290.
- MORGAN, D. L.; ALLEN, D. G. (1999). Early events in stretch-induced muscle damage. *J. Appl. Physiol.* **87**:2007-2015.
- MORGENSTERN, R. (2004). Oxidative Stress and Human Genetic Variation. *J. Nutr.* **134**: 3173S-3174S
- NAGEL D.; SEILER D.; FRANZ H. JUNG K. (1990). Ultra-long-distance running and the liver. *Int. J. Sports Med.* **11**(6): 441-445.
- NASCIMBEN, L.; INGWALL, J. S.; PAULETTO, P.; FRIEDRICH, J.; GWATHMEY, J. K.; SAKS, V.; PESSINA, A. C.. ALLEN, P.D. (1996). Creatine Kinase System in Failing and Nonfailing Human Myocardium. *Circulation.* **94**: 1894-1901.
- NATARAJAN, A. T.; OBE, G. (1982). Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays. In: John A Heddle (ed) Mutagenicity - New Horizons in Genetic Toxicology. Academic Press, New York, pp 171-212.
- NESTEL, P.; CLIFTON, P.; NOAKES, M. (1994). Effects of increasing dietary palmitoleic acid compared with palmitic and oleic acids on plasma lipids of hypercholesterolemic men. *J. Lipid Res.* **35**: 656-662.
- NIES, A. M.; HARTMANN, A.; GRUNERT-FUCHS, M.; POCH, B.; SPEIT, G. (1996). DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int. J. Sports Med.* **17**: 397-403.
- NISHIZAKA, M. K.; CALHOUN, D. A. (2006). Cardiovascular risk of systolic versus diastolic blood pressure in Western and non-Western countries. *J. Hypertens.* **24**: 435-436.
- OBARZANEK, E.; SACKS, F. M.; VOLLMER, W. M.; BRAY, G. A.; MILLER III, E. R.; LIN, P. H.; MOST-WINDHAUSER, M. M.; MOORE, T. J.; SWAIN, J. F.; BALES, C. W.; PROSCHAN, M. A. (2001). Effects on blood lipids of a blood pressure-lowering diet: the dietary approaches to stop hypertension (DASH) Trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **74**: 80-89.
- OBERLEY, L. W. (2005). Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed. Pharmacother.* **59**(4): 143-148.
- OH, B.; KIM, S. Y.; KIM, D. J.; LEE, J. Y.; LEE, J. K.; KIMM, K.; PARK, B. L.; SHIN, H. D.; KIM, T. H.; PARK, E. K.; KOH, J. M.; KIM, G. S. (2007). Associations of catalase gene polymorphisms with bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal women. *J. Med. Genet.* **44**: e62.
- OLIVEIRA, M. N. S.; GUSMÃO, E.; LOPES, P. S. N.; SIMÕES, M. O. M.; RIBEIRO, L. M.; DIAS, B. A. S. (2006). Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Rev. Bras. Frutic.* **28**(3): 380-386.
- OLSON, S. H.; CARLSON, M. D. A.; OSTRER, H.; HARLAP, S.; STONE, A.; WINTERS, M.; AMBROSONE, C. B. (2004). Genetic variants in SOD2, MPO, and NQO1, and risk of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **93**: 615-620.
- OMIM - *140100 - Haptoglobin; HP. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=OMIM&dopt=Detailed&mp=dispomimTemplate&list_uids=140100> Acesso em 23/11/2008.
- OWEN, R. W.; HAUBNER, R.; MIER, W.; GIACOSA, A.; HULL, W. E.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. (2003). Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food Chem. Toxicol.* **41**: 703-717.
- OZBEN, T. (2007). Oxidative stress and apoptosis: Impact on cancer therapy. *J. Pharm. Sci.* **96**(9): 2181 - 2196.
- PANAYIOTIDIS, M.; COLLINS, A. R. (1997). Ex vivo assessment of lymphocyte antioxidant status using comet assay. *Free Radicals Res.* **27**: 533-537.
- PAOLINI, M.; ABDEL-RAHMAN, S. Z.; SAPONE, A.; PEDULLI, G. F.; PEROCCO, P.; CANTELLI-FORTI, G.; LEGATOR, M. S. (2003). β -carotene: a cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? *Mutation Res.* **543**: 195-200.
- PARK, H. H.; HA, E.; UHM, Y. K.; JIN, S. Y.; KIM, Y. J.; CHUNG, J. H.; LEE, M. H. (2006). Association study between catalase gene polymorphisms and the susceptibility to vitiligo in Korean population. *Experim. Dermatol.* **15**: 377-380.

- PAULA-JÚNIOR, W. (2004). Atividades Biológicas in vitro de Extratos Hidroetanólicos de Folhas e do Mesocarpo Interno de *Caryocar brasiliense* Cambess. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná (UFPR). Curitiba/PR. Disponível em <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/7920>> Acesso em 09/06/2007.
- PEIJIE, C.; HONGWU, L.; FENGPENG, X.; JIE, R.; JIE, Z. (2003). Heavy load exercise induced dysfunction of immunity and neuroendocrine responses in rats. *Life Sci.* **72**: 2255-2262.
- PELLANDA, L. C.; Echenique, L.; Barcellos, L. M. A.; Maccari, J.; Borges, F. K.; Zen, B. L. (2002). Doença cardíaca isquêmica: a prevenção inicia durante a infância. *J. Pediatr.* **78**(2): 91-96.
- PETERS, E.; EDEN, M.; TYLER, N.; RAMAUTAR, A.; CHUTURGOON, A. (2006). Prolonged exercise does not cause lymphocyte DNA damage or increased apoptosis in well-trained endurance athletes. *Eur. J. Appl. Physiol.* **98**(2): 124-131.
- PETIBOIS C.; DÉLÉRIS, G. (2004). Oxidative stress effects on erythrocytes determined by FT-IR Spectrometry. *Analyst* **129**: 912 - 916.
- PETIBOIS C.; DÉLÉRIS, G. (2005). Erythrocyte Adaptation to Oxidative Stress in Endurance Training. *Arch. Med. Res.* **36**: 524-531.
- POLANCZYK, C. A. (2005). Fatores de Risco Cardiovascular no Brasil: os Próximos 50 Anos! *Arq. Bras. Cardiol.* **84**(3): 199-201.
- POTSCH, A. A.; SIQUEIRA FILHO, A. G.; TURA, B. R.; GAMARSKI, R.; BASSAN, R.; NOGUEIRA, M. V.; MOUTINHO, M. A. E.; SILVA, A. C. M.; VILLACORTA, H.; CAMPOS, A. L. (2006). C-reactive protein diagnostic and prognostic value in patients presenting at the emergency room with chest pain. *Arq. Bras. Cardiol.* **87**(3): 275-280.
- POTTELBERGH, V.; BRAECKMAN, L.; DE BACQUER, D.; DE BACKER, G.; KAUFMAN, J. M. (2003). Differential contribution of testosterone and estradiol in the determination of cholesterol and lipoprotein profile in healthy middle-aged men. *Atherosclerosis* **166**: 95-102.
- POVIRK, L. F. (1996). DNA damage and Mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat. Res.* **355**: 71-89.
- POVIRK, L. F.; AUSTIN, M. J. F. (1991). Genotoxicity of bleomycin. *Mutat. Res.* **257**: 127-143.
- PROSKE U., MORGAN D. L. (2001). Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *J Physiol.* **537**:333-45.
- PUTNEY, S.; HERLIHY, W.; ROYAL, N.; PANG, H.; APOSHIAN, H. V.; PICKERING, L.; BELAGAJE, R.; BIEMANN, K.; PAGE, D.; KUBY, S.; SCHIMMEL, P. (1984). Rabbit Muscle Creatine Phosphokinase. *J. Biol. Chem.* **259**(23): 14317-14320.
- QIZILBASH, N. (1987). Blood pressure and fat intake: a review. *R. Soc. Med.* **80**(4): 225-228.
- RADAK, Z.; CHUNG, H. Y.; GOTO, S. (2008). Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Rad. Biol. Med.* **44**: 153-159.
- RADAK, Z.; KUMAGAI, S.; NAKAMOTO, H.; GOTO, S. (2007). 8-Oxoguanosine and uracil repair of nuclear and mitochondrial DNA in red and white skeletal muscle of exercise-trained old rats. *J. Appl. Physiol.* **102**:1696-1701.
- RAMOS, M. I. L.; UMAKI, M. C. S.; HIANE, P. A.; RAMOS-FILHO, M. M. (2001). Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitamínicos "A" da polpa de piqui (*Caryocar brasiliense* Camb.). *B. CEPPA* **19**(1): 23-32.
- RATNASINGHE, D.; TANGREA, J. A.; ANDERSEN, M. R.; BARRETT, M. J.; VIRTAMO, J.; TAYLOR, P. R.; ALBANES, D. (2000). Glutathione Peroxidase Codon 198 Polymorphism Variant Increases Lung Cancer Risk. *Cancer Res.* **60**: 6381-6383.
- RAVN-HAREN, G.; OLSEN, A. TJONNELAND, A.; DRAGSTED, L. O.; NEXO, B. A.; WALLIN, H.; OVERVAD, K.; RAASCHOU-NIELSEN, O.; VOGEL, U. (2006). Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis* **27**(4): 820-825.
- RIBEIRO, L. F. P.; BALDISSERA, V.; BALAKIAN, P.; SOARES, A. R. (2004). Limiar anaeróbio em natação: comparação entre diferentes protocolos. *Rev. bras. Educ. Fís. Esp.* **18**(2): 201-212.
- RIBEIRO, L. R. (2003). Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. Canoas (RS), pp. 173-178.
- ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. (2008). Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chem.* **110**(3):711-717.

- ROGUIN, A.; KOCH, W.; KASTRATI, A.; ARONSON, D.; SCHOMIG, A.; LEVY, A. P. (2003). Haptoglobin genotype is predictive of major adverse cardiac events in the one year period after PTCA in individuals with diabetes. *Diab. Care* **26**: 2628 -2631.
- ROSENSON, R. S.; LOWE, G. D. O. (1998). Effects of lipids and lipoproteins on thrombosis and rheology. *Atherosclerosis* **140**: 271-280.
- SADRZADEH, S. M. H.; BOZORGMEHR, J. (2004). Haptoglobin Phenotypes in Health and Disorders. *Am. J. Clin. Pathol.* **12**(S1): S97-S104.
- SAEED, S. A.; URFY, M. Z. S.; ALI, T. M.; KHIMANI, F. W.; GILANI, A. V. H. (2005). Antioxidants: their role in health and disease. *Int. J. Pharmacol.* **1**(3): 226-233.
- SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; DOMBROSKI, J. L. D.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, A. A. N. (2005). Pequiizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.): uma espécie promissora do cerrado brasileiro. Boletim Agropecuário da Universidade Federal de Lavras (UFLA), 64. p. 5-33. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdf/bol_64.pdf> Acesso em 29/10/2005.
- SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M.; SILVA, D. P. C.; MARTINOTTO, C.; SOARES, F. P.; PAIVA, P. D. O. (2006). MICROPROPAGAÇÃO DE PEQUIZEIRO (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Rev. Bras. Frutic.* **28**(2): 293-296.
- SANTOS, H. S. E CRUZ, W. M. S. (2001). A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. *Rev. Bras. Cancerol.* **47**(3): 303-308.
- SANTOS, M. E.; GALVÃO, T.; OLIVEIRA, A. L. M. (2008). Tamanho de Plaquetas e Doença Vascular. *NewsLab* **87**: 70-76. Disponível em <<http://www.newslab.com.br/newslab/pdf/artigos87/art07.pdf>> Acesso em 17/01/2009.
- SANTOS, P.; VASCONCELOS, E. M. A.; NORONHA, J. F. A.; GROTO, H. Z. W. (2007). Avaliação das plaquetas reticuladas e plaquetas ativadas em Pacientes com dislipidemia. Disponível em <<http://www.sysmex.com.br/pdf/Poster-UNICAMP2.pdf>> Acesso em 17/01/2009.(b)
- SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. (2007). Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Quim. Nova* **30**(1): 159-170.(a)
- SANTOS-SILVA A, REBELO MI, CASTRO EMB, BELO L, GUERRA A, REGO C, QUINTANILHA A. (2001). Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. *Clin. Chim. Acta* **306**:119-126.
- SCHMID, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Res.* **31**: 9-15.
- SCHMIDT, W.; MAASSEN, N.; TROST, F.; BÖNING, D. (1988). Training induced effects on blood volume, erythrocyte turnover and haemoglobin oxygen binding properties. *Eur J. Appl. Physiol.* **57**:490-498.
- SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. (2004). Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev. Bras. Med. Esporte* **10**(4): 314-318.
- SEGALL S. D.; ARTZ W. E.; RASLAN D. S.; FERRAZ V. P.; TAKAHASHI J. A. (2006). Triacylglycerol analysis of pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.) oil by electrospray and tandem mass spectrometry. *JSFA* **86**(3): 445-452.
- SHIMODA-MATSUBAYASHI, S.; MATSUMINE, H.; KOBAYASHI, T.; NAKAGAWA-HATTORI, Y.; SHIMIZU, Y.; MIZUNO, Y. (1996). Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**: 561-565.
- SHINKAI, T.; MÜLLER, D. J.; LUCA, V. D.; SHAIKH, S.; MATSUMOTO, C.; HWANG, R.; KING, N.; TRAKALO, J.; POTAPOVA, N.; ZAI, G.; HORI, H.; OHMORI, O.; MELTZER, H. Y.; NAKAMURA, J.; KENNEDY, J. L. (2006). Genetic association analysis of the glutathione peroxidase (GPX1) gene polymorphism (Pro197Leu) with tardive dyskinesia. *Psychiatry Res.* **141**: 123- 128.
- SIES, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* **215**: 213-219.
- SIGNORI, L. U.; PLENTZ, R. D. M.; IRIGOYEN, M. C.; SCHAAN, B. D. (2007). O Papel da Lipemia Pós-Prandial na Gênese da Aterosclerose: Particularidades do Diabetes Mellitus. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* **51**(2): 222-231.
- SILVA, A. P. P.; MELO, B.; FERNANDES, N. Fruteiras Do Cerrado. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/fruteiras%20do%20cerrado.html>> Acesso em 29/10/2005.

- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHENEIDER, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experim. Cell Res.* **175**: 184-191.
- SLANGER, T. E.; CHANG-CLAUDE, J. C. C.; WANG-GOHRKE, S. (2006). Manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism, environmental modifiers, and risk of breast cancer in a German population. *Cancer Causes Control* **17**: 1025-1031.
- SMIRNOFF, N. (2003). Vitamin C booster: Identification and manipulation of a new enzyme from strawberry demonstrates the feasibility of engineering vitamin C synthesis in plants. *Nature Biotechnol.* **21**: 134-136.
- SORIGUER, F.; ROJO-MARTÍNEZ, G.; DOBARGANES, M. C.; ALMEIDA, J. M. G.; ESTEVA, I.; BELTRÁN, M.; ADANA, M. S. R. D.; TINAHONES, F.; GÓMEZ-ZUMAQUERO, J. M.; GARCÍA-FUENTES, E.; GONZÁLEZ-ROMERO, S. (2003). Hypertension is related to the degradation of dietary frying oils. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**: 1092-1097.
- STEINBERG, D. (1997). Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance. *J. Biol. Chem.* **272**(34): 20963-20966.
- STERN, A. (1985). Red cell oxidative damage. In: H. Sies (ed), *Oxidative stress*. Academic Press, London. pp. 331-349.
- STEWART, S. F.; LEATHART, J. B.; CHEN, Y.; DALY, A. K.; ROLLA, R.; VAY, D.; MOTTARAN, E.; VIDALI, M.; ALBANO, E.; DAY, C. P. (2002). Valine-Alanine Manganese Superoxide Dismutase Polymorphism Is Not Associated With Alcohol-Induced Oxidative Stress or Liver Fibrosis. *Hepatology* **36**(6): 1355 - 1360.
- STUPKA, N.; TARNOPOLSKY, M. A.; YARDLEY, N. J.; PHILLIPS, S. M. (2001). Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. *J. Appl. Physiol.* **91**:1669-1678.
- SULEIMAN, M.; ARONSON, D.; ASLEH, R.; KAPELOVICH, M. R.; ROGUIN, A.; MEISEL, S. R.; SHOCHAT, M. SULEIMAN, A.; REISNER, S. A.; MARKIEWICZ, W.; HAMMERMAN, H.; LOTAN, R.; LEVY, N. S.; LEVY, A. P. (2005). Haptoglobin polymorphism predicts 30-day mortality and heart failure in patients with diabetes and acute myocardial infarction. *Diabetes* **19**: 2802-2806.
- SUREDA, A.; TAULER, P.; AGUILÓ, A.; CASES, N.; FUENTESPINA, E.; CÓRDOVA, A.; TUR, J. A.; PONS, A. (2005). Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free Rad. Res.* **39**(12): 317-1324.
- TAUFER, M.; PERES, A.; ANDRADE, V. M.; OLIVEIRA, G.; SÁ, G.; CANTO, M. E. P.; SANTOS, A. R.; BAUER, M. E.; CRUZ, I. B. M. (2005). Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **60**(4): 432-438.
- TONDO, C. V.; MUNDT, C.; SALZANO, F. M. (1963). Haptoglobin types in Brazilian Negroes. *Ann. Hum. Genet.* **26**: 325-331.
- TRABER, M. G. (2006). Relationship of vitamin E metabolism and oxidation in exercising human subjects. *Br. J. Nutr.* **96**(S1): S34-S37.
- TSENG, C. F.; LIN, C. C.; HUANG, H. Y.; LIU, H. C.; MAO, S. J. T. (2004). Antioxidant role of human haptoglobin. *Proteomics*. **4**: 2221-2228.
- UKKOLA, O.; ERKKILÄ, P. H.; SAVOLAINEN, M. J.; KESÄNIEMI, Y. A. (2001). Lack of association between polymorphisms of catalase, copper/zinc superoxide dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Intern. Med.* **249**: 451-459.
- URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* **189**(1): 41-54.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**:44-84.
- VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**: 1-40.
- VAN VLIERBERGHE, H.; LANGLOIS, M.; DELANGHE, J. (2004). Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease. *Clin. Chim. Acta* **345**: 35-42.
- VENTRIGLIA, M.; SCASSELLATI, C.; BONVICINI, C.; SQUITTI, R.; BEVACQUA, M. G.; FORESTI, G.; TURA, G. B.; GENNARELLI, M. (2006). No association between Ala9Val functional polymorphism of MnSOD gene and schizophrenia in a representative Italian sample. *Neurosci. Lett.* **410**: 208-211.

- VERA, R.; NAVES, R. V.; NASCIMENTO, J. L.; CHAVES, L. J.; LEANDRO, W. M.; SOUZA, E. R. B. (2005). Caracterização física de frutos do pequi (Caryocar brasiliense Camb.) no estado de Goiás. *Pesq. Agropec. Trop.* **35**(2): 71-79.
- VILARDI, T. C. C.; RIBEIRO, B. G.; SOARES, E. A. (2001). Distúrbios nutricionais em atletas femininas e suas inter-relações. *Rev. Nutr.* **14**(1): 61-69.
- VILLA-CABALLERO, L.; NAVA-OCAMPO, A. A. ; FRATI-MUNARI, A.; PONCE-MONTER, H. (2000). Oxidative stress, acute and regular exercise: are they really harmful in the diabetic patient? *Med. Hypotheses* **55**(1), 43-46.
- WANG, L.; MILLER, D. P.; SAI, Y.; LIU, G.; SU, L.; WAIN, J. C.; LYNCH, T. J.; CHRISTIANI, D. C. (2001). Manganese Superoxide Dismutase Alanine-to-Valine Polymorphism at Codon 16 and Lung Cancer Risk. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**(23): 1818-1821.
- WANNAMETHEE, S. G.; SHAPER, A. G. (2001). Physical Activity in the Prevention of Cardiovascular Disease. *Sports Med.* **31**(2): 101-114.
- WASOWICZ, W.; NÈVE, J.; PERETZ, A. (1993). Optimized Steps in Fluorometric Determination of Thiobarbituric Acid-Reactive Substances in Serum: Importance of Extraction pH and Influence of Sample Preservation and Storage. *Clin. Chem.* **39**(12): 2522-2526.
- WASSEL J. (2000) Haptoglobin: Function and Polymorphism. *Clin. Lab.* **46**:547-552.
- WATARU, A.; YUJI, N.; TOSHIKAZU, Y. (2003). Chronic Exercise and Protection of Oxidative Damage Induced by Ischemia-Reperfusion. *Descende Sports Sci.* **24**:139-144
- WATTANAPITAYAKUL, S. K.; BAUER, J. A. (2001). Oxidative pathways in cardiovascular disease Roles, mechanisms, and therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.* **89**: 187- 206.
- WITT, E. H.; REZNICK, A. Z.; VIGUIE, C. A.; STARKE-REED, P.; PACKER, L. (1992). Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J. Nutr.* **122**(S3): 766-773.
- WOBETO, V. P. A.; ROSIM, E. T.; MELO, M. B.; CALLIARI, L. E. P.; SONATI, M. F. (2007). Haptoglobin polymorphism and diabetic retinopathy in Brazilian patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **77**: 385-388.
- WOODS, J. A.; LU, Q.; LOWDER, T. (2000). Exercise-induced modulation of macrophage function. *Immunol. Cell Biol.* **78**: 545-553.
- YANO, A.; YAMAMOTO, Y.; MIYAISHI, S.; ISHIZU, H. (1998). Haptoglobin Genotyping by Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Amplification. *Acta Med. Okayama* **52**(4):173-181.
- YOUNG, R. P.; HOPKINS, R.; BLACK, P. N.; EDDY, C.; WU, L.; GAMBLE, . D.; MILLS, G. D.; GARRETT, J. E.; EATON, T. E.; REES, M. I. (2006). Functional variants of antioxidant genes in smokers with COPD and in those with normal lung function. *Thorax* **61**: 394-399.
- YUSOF, A.; LEITHAUSER, R. M.; ROTH, H. J.; FINKERNAGEL, H.; WILSON, M. T.; BENEKE, R. (2007). Exercise-induced hemolysis is caused by protein modification and most evident during the early phase of an ultraendurance race. *J. Appl. Physiol.* **102**: 582-586.
- ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. Hematologia - Fundamentos e Prática. São Paulo, Ed. Atheneu, 2004.
- ZHAO, H.; LIANG, D.; GROSSMAN, H. B.; WU, X. (2005). Glutathione peroxidase 1 gene polymorphism and risk of recurrence in patients with superficial bladder cancer. *Urology* **66**(4): 769-774.

10. ANEXOS

10.1. Anexo I – Parecer CONEP



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 967/2005

Registro CONEP: 11357 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0083.0.012.000-04

Processo nº 25000.001668/2005-18

Projeto de Pesquisa: *Avaliação do potencial antioxidante e antimutagênico do extrato de pequi (caryocar brasiliense camb)*

Pesquisador Responsável: Dr. Cesar Koppe Grisolia

Instituição: Universidade de Brasília/UNB. CEP Fac. de Ciências da Saúde/UNB

Área Temática Especial: Genética Humana

Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 365/2005, cabem as seguintes considerações:

- Foram esclarecidas as pendências relativas à metodologia e adequações no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, bem como a apresentação do questionário antes ausente.
- As informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.
- O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

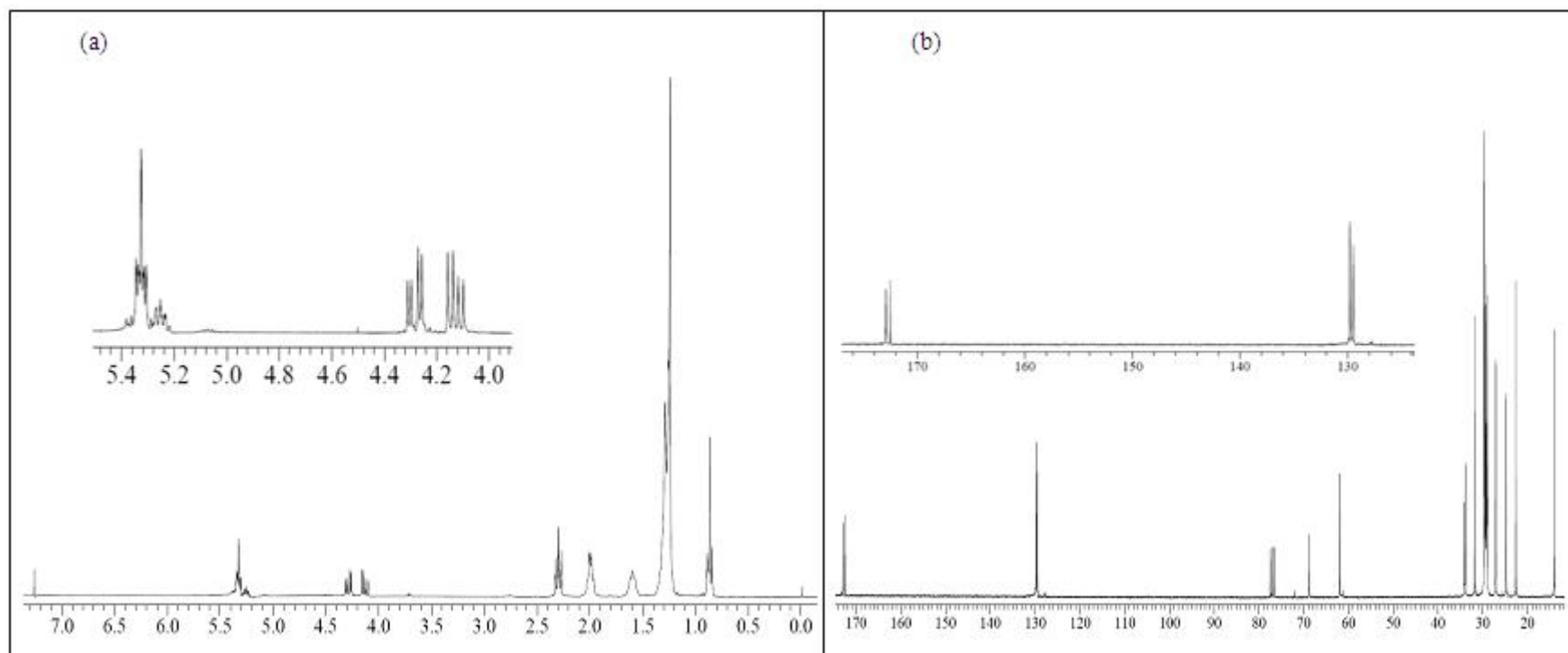
Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 17 de maio de 2005.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

10.2. Anexo II – Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia Gasosa (CG) dos extratos da polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)

1. Espectros de RMN (300 MHz) da fração orgânica – extratos hexânico (EHP) e clorofórmico (ECP) em solvente CDCl_3 : a) espectro RMN ^1H ; b) espectro RMN ^{13}C .



As insaturações do oleato de glicerila, presente majoritariamente na fração orgânica (60%), foram observadas por RMN ^1H e ^{13}C na região olefínica, em 5,34 ppm (multipeto) e em 129,3 e 129,7 ppm, respectivamente. A região alifática (CH_2 e CH_3), observada entre 0,80 e 1,70 ppm no espectro RMN ^1H , incluiu também a absorção correspondente ao palmitato (40%). As funções acilas relativas aos ésteres foram apresentadas em 172,3 e 172,7 ppm.

2. Análise da fração orgânica (EHP e ECP) da polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) por RMN ^1H e ^{13}C .

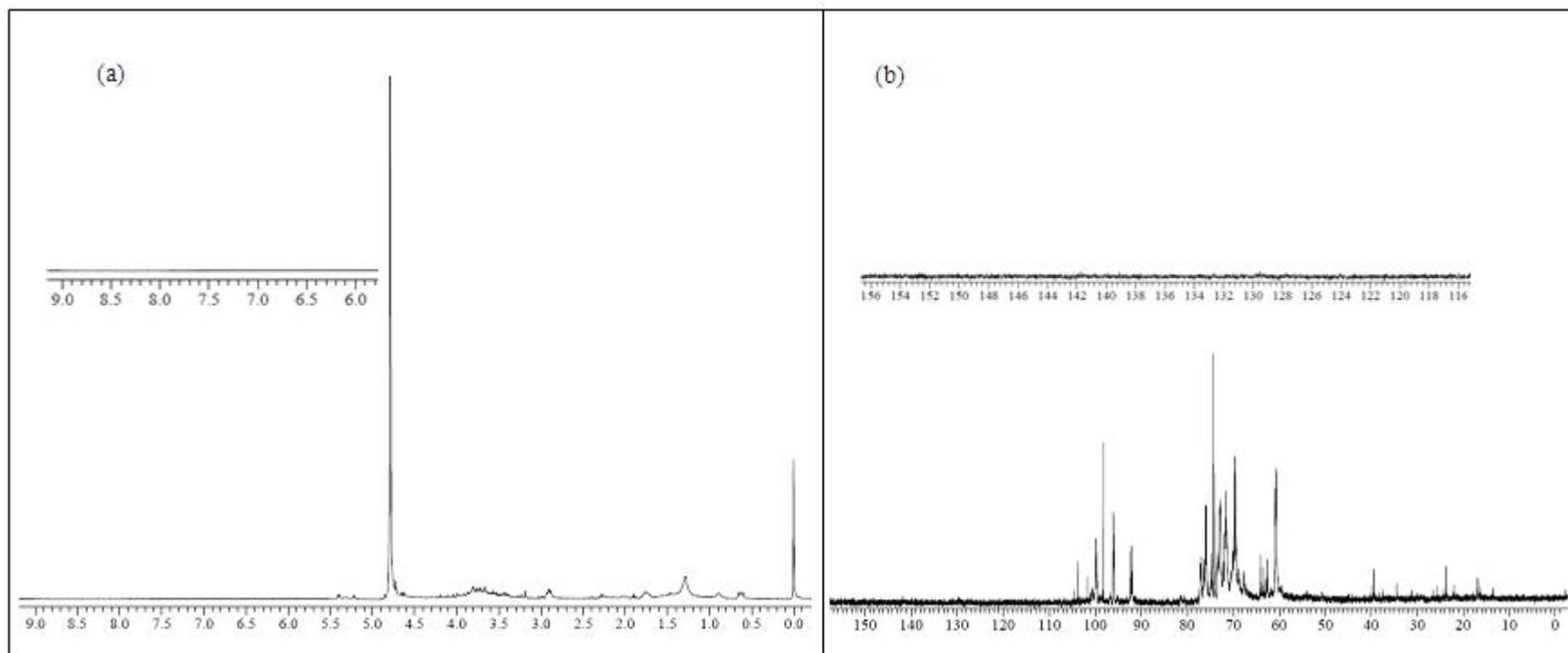
δ_{H} (ppm)	Natureza dos Hidrogênios	J (Hz)	Natureza dos Carbonos	δ_{C} (ppm)
0,88	CH_3	7,0	CH_3	13,9
1,21-1,31	$\text{CH}_2\text{---CH}_3$	-	$\text{CH}_2\text{---CH}_3$	22,5
1,21-1,31	7CH_2	-	7CH_2	28,2-31,7
1,60-1,70	$\text{CH}_2\text{---CH}_2\text{---CO}$	-	$\text{CH}_2\text{---CH}_2\text{---CO}$	24,7
1,98-2,10	$\text{CH}_2\text{---C=C}$	-	$\text{CH}_2\text{---C=C}$	27,0
2,31	$\text{CH}_2\text{---C=O}$	-	$\text{CH}_2\text{---C=O}$	33,9
4,14 e 4,30	$\text{CH}_2\text{---C---O}$	4,3 e 12,0	$\text{CH}_2\text{---C---O}$	61,8
5,27	CH---C---O	7,8	CH---C---O	68,7
5,34	CH=CH	-	CH=CH	129,3 e 129,7
-	-	-	C=O	172,3 e 172,7

Hidrogênios e carbonos foram marcados por técnicas 2D (COSY e HMQC).

3. Composição relativa de óleos da fração orgânica (ECP e EHP) da polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) – Analisador Varian Star 3400 CX Gas Chromatography (GC).

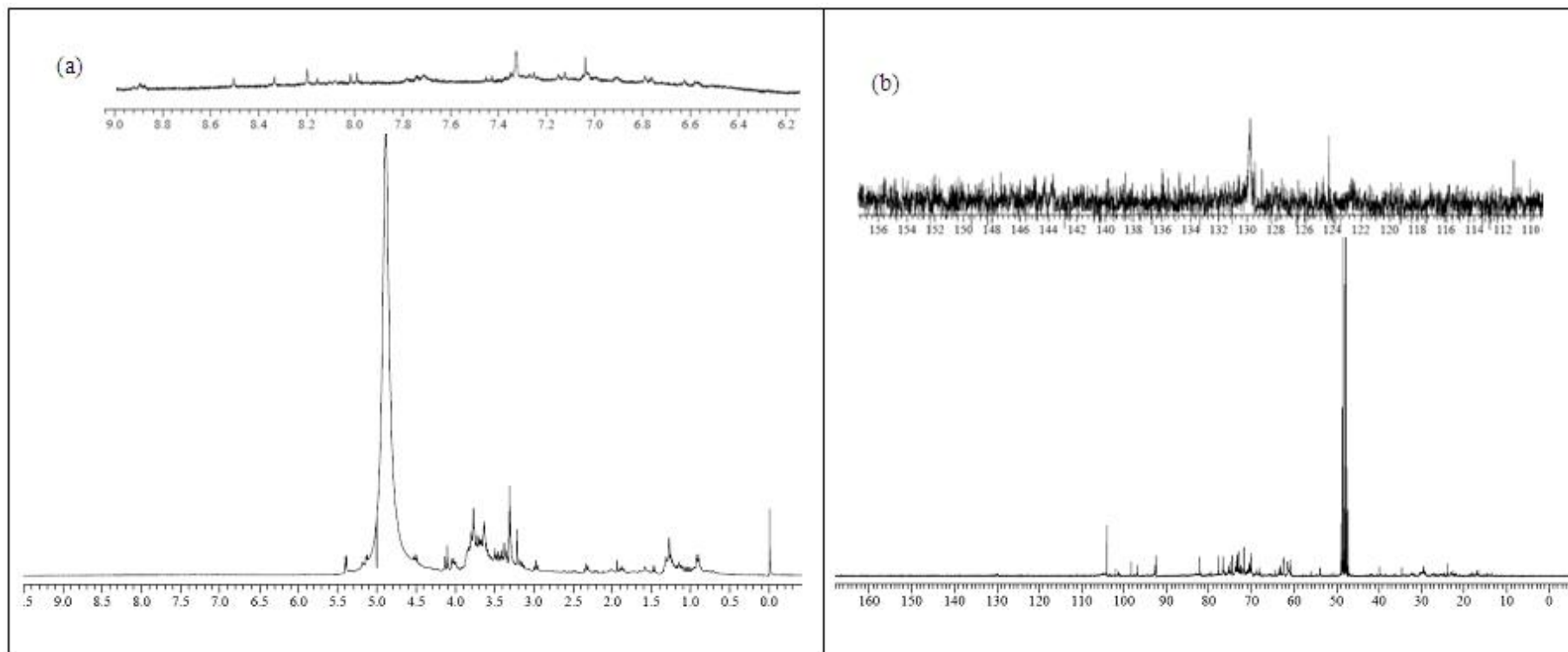
Ácidos graxos saturados	Número de Carbonos	Quantidade (% por 100g de polpa)
Palmítico	C16:0	41,78
Esteárico	C18:0	1,28
Araquídico	C20:0	0,12
Total		43,18
Ácidos graxos insaturados	Número de Carbonos e de Insaturações	Quantidade (% por 100g de polpa)
Mono-insaturados		
Oléico	C18:1 (ω 9)	54,28
Palmitoléico	C16:1 (ω 7)	0,67
Bi-insaturado		
Linoléico	C18:2 (ω 6)	1,36
Tri-insaturado		
Linolênico	C18:3 (ω 3)	0,51
Total		56,82

4. Espectro de RMN (300 MHz) do extrato aquoso (EAP) em solvente D₂O: a) espectro RMN ¹H; b) espectro RMN ¹³C.



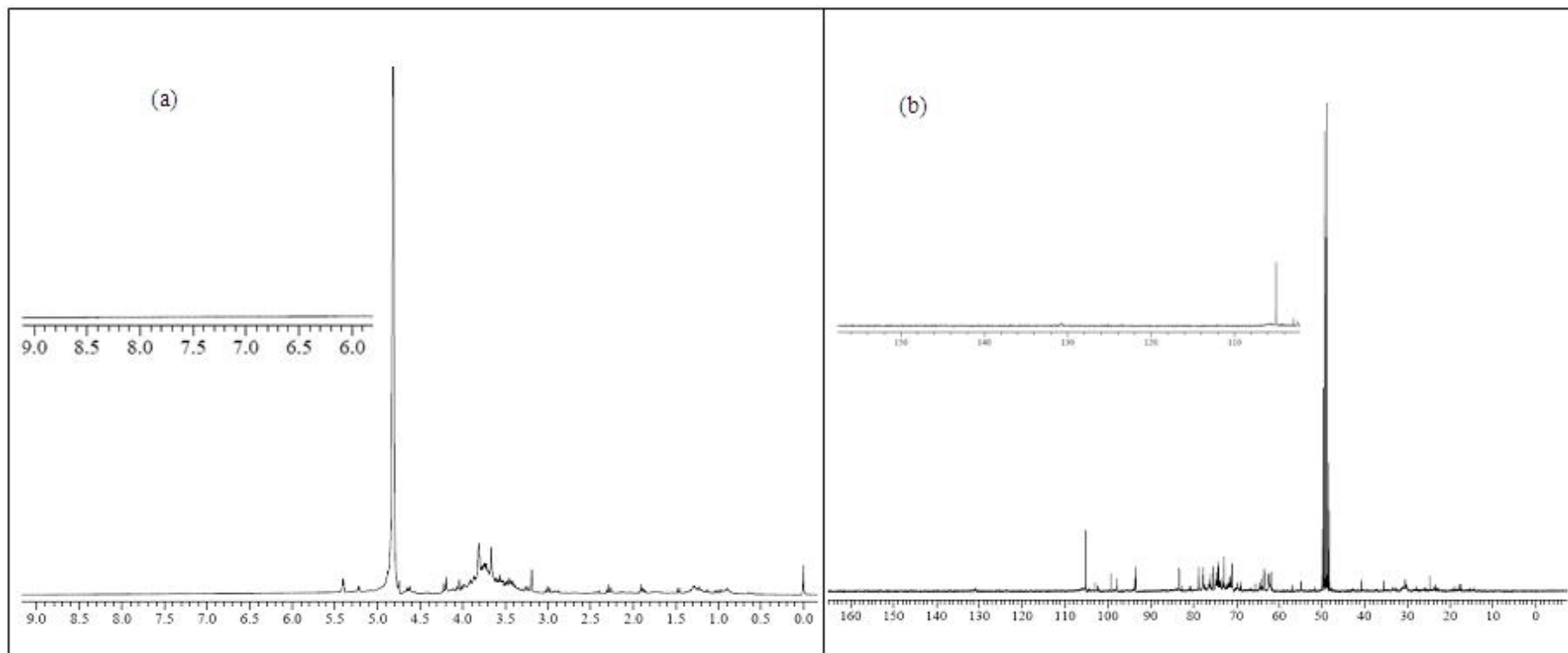
Foram observadas absorções características de carboidratos no RMN ¹H (3,00–5,50 ppm) e no RMN ¹³C (50,0–110,0 ppm). As múltiplas absorções observadas indicaram uma mistura complexa, provavelmente provocada pela polimerização.

5. Espectro de RMN do extrato etanólico (EEP) em solvente CH₃OD: a) espectro RMN ¹H; b) espectro RMN ¹³C RMN.



Foram observadas absorções características de carboidratos no RMN ¹H (3,00-5,50 ppm) e no RMN ¹³C (50,0–110,0 ppm). As múltiplas absorções observadas indicaram uma mistura complexa, provavelmente provocada pela polimerização. Absorções características de região aromática foram observadas no RMN ¹H a 7,00–9,00 ppm e no RMN ¹³C a 120–145 ppm, as quais provavelmente representam os compostos fenólicos já descritos para a espécie *Caryocar brasiliense* (Roesler *et al.*, 2008).

6. Espectro de RMN do extrato hidro-etanólico (EHEP) em solvente CH_3OD : espectro RMN ^1H ; b) espectro RMN ^{13}C .



Foram observadas absorções características de carboidratos no RMN ^1H (3,00-5,50 ppm) e no RMN ^{13}C (50,0–110,0 ppm). As múltiplas absorções observadas indicaram uma mistura complexa, provavelmente provocada pela polimerização.

10.3. Anexo III – Artigo



Genetics and Molecular Biology, 31, 4, 956-963 (2008)
Copyright © 2008, Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil
www.sbg.org.br

Research Article

Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp

Ana L. Miranda-Vilela¹, Inês S. Resck² and Cesar K. Grisolia¹

¹Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

²Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Abstract

The daily consumption of natural antioxidants protects against oxidative damage caused by reactive oxygen species (ROS), including DNA damage, and can reduce the risk of cancer, atherosclerosis and other degenerative diseases. The pulp of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit, a tree native to the Brazilian savannah, contains several compounds with antioxidant properties, including carotenoids, vitamin C, phenolic compounds such as flavonoids, saponins and tannins, and essential oils. In this work, we examined the ability of organic and aqueous extracts of pequi fruit pulp to protect against the genotoxicity induced by two antineoplastic drugs, cyclophosphamide (CP) and bleomycin (BLM). Micronucleus tests with mouse bone marrow cells and single-cell gel electrophoresis (comet assay) with peripheral blood leukocytes were used to examine the effects of CP and BLM, respectively. The antioxidant activity of the extracts was assessed by measuring lipid peroxidation with the TBARS method in mouse plasma. The fruit pulp extracts had no clastogenic or genotoxic effects in the cells studied, but both extracts protected against oxidative DNA damage caused by BLM or CP, indicating an ability to inhibit chemical mutagenesis *in vivo*. However, the protective effect against oxidative DNA damage depended on the dose of extract used. At the doses tested, the aqueous extract enhanced lipid peroxidation in mice of both sexes, especially in males. In contrast, the organic extract enhanced lipid peroxidation only in male mice, with no significant effect in females. These results suggest that, with adequate adjustment of the dose, an organic extract of pequi fruit pulp could be a useful dietary supplement with natural antioxidant activity, at least in females.

Key words: antigenotoxic, antioxidant, *Caryocar brasiliense*, comet assay, micronucleus, pequi pulp extracts, reactive oxygen species, TBARS assay.

Received: October 10, 2007; Accepted: April 8, 2008.

Introduction

The pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb.), which belongs to the family Caryocaraceae, is very common in the Brazilian savannah ("cerrado"). Pequi fruit has an internal mesocarp (pequi pulp) that is used in folk medicine to treat a number of respiratory diseases (Almeida and Silva, 1994; Ramos *et al.*, 2001). Each 100 g of pulp contains 20%-27% lipids that constitute the pulp oil, 2.2-6.0% protein, 11.6% fibers, 19.7% total carbohydrates and 225-267.9 kcal (Almeida, 1998; Boletim Informativo UFMG n° 1511, 2005). According to Almeida (1998), the fatty acid composition of pequi pulp oil consists of 51% mono-unsaturated acids, mainly oleic acid, 49% saturated oils (principally palmitic acid) and ~2% polyunsaturated linoleic acid.

Pequi oil is also used in folk medicine for treating ophthalmic problems related to vitamin A deficiency, a use

supported by the high content of carotenoids with pro-vitamin A activity (Almeida and Silva, 1994; Almeida, 1998; Ramos *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006). In addition to β -carotene, pequi pulp contains other carotenoids, such as lycopene (Oliveira *et al.*, 2006), ζ -carotene, cryptoflavin, β -cryptoxanthine, anteraxanthine, zeaxanthine, mutatoxanthine, violanxanthine, lutein and neoxanthine (Ramos *et al.*, 2001; Azevedo-Meleiro and Rodriguez-Amaya, 2004; Oliveira *et al.*, 2006). Pequi pulp is also rich in vitamin C (Barbosa and Amante, 2005). W. Paula-Júnior (MSc Dissertation, Federal University of Paraná, Brazil, 2004) identified phenolic compounds, such as flavonoids, saponins and essential oils in hydroethanolic extracts of the internal mesocarp of pequi pulp, and Almeida (1998) reported a tannin content of 0.17 mg/100 g of pulp. All of these components of pequi pulp have antioxidant properties (Sies, 1993; Tseng *et al.*, 2004).

Natural antioxidants in the human diet can attenuate the effects of mutagens and genotoxic carcinogens. Some antioxidants, such as vitamins A, C and E, minimize the

Send correspondence to Cesar Koppe Grisolia. Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 70910-900 Brasília, DF, Brazil. E-mail: grisolia@unb.br.

side effects of antineoplastic drugs and can improve cancer chemotherapy. An increase in the dietary content of antioxidants through the increased ingestion of fruits and vegetables rich in these compounds can decrease the oxidation of DNA by free radicals, thereby preventing cancer and other degenerative diseases. Oxidative damage to biomolecules caused by stress is one of the major risk factors for atherosclerosis, mainly through the oxidation of low density lipoprotein (LDL) in the blood. Thus, cancer, atherosclerosis and many other degenerative diseases share a common mechanism (Kong and Lillehei, 1998; Santos and Cruz, 2001; Dusinská *et al.*, 2003).

Some dietary antioxidants can act as adjuvants in cancer therapy because of their ability to induce apoptosis *in vitro*. Antioxidants also show promise in cancer therapy because of their palliative action in reducing painful side effects associated with chemotherapy (Borek, 2004). Khouri *et al.* (2007) showed that an aqueous extract of pequi pulp can prevent mouse bone marrow cells against chromosomal aberrations induced by bleomycin. Experiments with cultured CHO-K1 cells also showed that this aqueous extract protected cells against the clastogenic effects of cyclophosphamide.

In this study, the anticlastogenic potential of an organic extract of pequi was evaluated in mice bone marrow cells *in vivo* by using the micronucleus assay. The antigenotoxic effects of aqueous (AEP) and organic (OEP) extracts of pequi pulp were also evaluated by single-cell gel electrophoresis (SCGE - comet assay) in mouse peripheral blood leukocytes. The antioxidant activity of AEP and OEP on lipid peroxidation in mouse blood was assessed by the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay.

Materials and Methods

Chemicals

Bleomycin (BLM) (CAS 011056-06-7) was obtained as Bleoxane sulphate from Bristol-Myers (São Paulo, Brazil) and cyclophosphamide (CP) (CAS 6055-19-2), sold as Genuxal, was from ASTA Medica Laboratory (São Paulo, Brazil).

Plant material

Pequi fruit was obtained *in natura* from vendors in Brasília, DF (Brazil) and the surrounding region. The internal mesocarp was peeled or grated to obtain the pulp, which was then packed in a covered pot and frozen to -86 °C.

Extraction procedure

Pequi pulp was extracted by the soxhlet procedure under an argon atmosphere using chloroform (organic extract of pequi pulp - OEP) or distilled water (aqueous extract of pequi pulp - AEP) as the solvent. After extraction, the extracts were submitted to evaporation under re-

duced pressure to remove the solvents, dried at high vacuum and immediately frozen at -86 °C.

Animals

Swiss white mice of both sexes (60 days old, 30 ± 2 g) obtained from the Central Animal Facility of the University of Brasília were housed in plastic cages (6 or 8/cage) at room temperature (20 ± 2 °C) on a 12 h light/dark cycle with lights on at 6 a.m. and free access to food and water. The experimental protocols described here were approved by the institutional Ethics Committee for Animal Research (Institute of Biological Science, University of Brasília).

Anticlastogenic and antigenotoxic assays

Micronucleus (MN) test

For the MN test, only the OEP was used since the AEP has already been studied by Khouri *et al.* (2007). Mice of both sexes were randomly allocated to groups M1 to M12 ($n = 8$ mice/group; Table 1). OEP (0.5 mL kg^{-1} or 1 mL kg^{-1} of body weight, respectively, corresponding to $15 \mu\text{L}$ and $30 \mu\text{L}$ of extract per mouse) was administered orally (*per os*, p.o.) by gavage daily for 10 days either alone or in combination with a single intraperitoneal (i.p.) injection of bleomycin diluted in 0.9% NaCl or aqueous cyclophosphamide (see Table 1 for concentrations). Control mice received filtered water in place of extract and no clastogen was administered. When required, the mice were killed by cervical dislocation and slides of bone marrow cells were prepared by a standard method (Schmid, 1975). Two thousand erythrocytes were counted per mouse (1000 normochromatic erythrocytes, NCE, and 1000 polychromatic erythrocytes, PCE) and the frequency of micronuclei (MN) in PCE and NCE, and the percentage of polychromatic erythrocytes (%PCE) were calculated.

Single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay (comet assay)

The SCGE assay was done essentially as for the MN test, using mice of both sexes randomly allocated to groups C1 to C9 ($n = 8$ mice/group; Table 2). The comet assay was done after the MN test, using OEP (0.5 mL kg^{-1}) and AEP (1 mL kg^{-1}) administered p.o. daily for 10 days, either alone or in combination with a single injection of bleomycin (25 mg kg^{-1} , i.p.) or two injections of cyclophosphamide (at 30 mg kg^{-1} , i.p. 48 h and 24 h before the mice were killed) (Table 2).

The comet assay (alkali method) proposed by Singh *et al.* (1988) and improved by Tice (1995) was used. Microscope slides were dipped briefly into 1.5% hot (60 °C) normal melting agarose prepared in phosphate-buffered saline (PBS). The slides were dried overnight at room temperature and then stored at 4 °C until used. Subsequently, freshly collected, heparinized peripheral blood ($20 \mu\text{L}$) was suspended in $120 \mu\text{L}$ of 0.5% low melting point agarose in

Table 1 - Micronuclear evaluation of bone marrow cells from Swiss white mice treated orally with an organic extract of pequi (*Caryocar brasiliense*) fruit pulp (OEP; 0.5 mL kg⁻¹ or 1 mL kg⁻¹) alone or with a single intraperitoneal injection of bleomycin (BLM) or cyclophosphamide (CP).

Group	Treatment	Polychromatic erythrocytes (PCE)		Normochromatic erythrocytes (NCE)	
		Cellular proliferation index (%PCE)	MN-PCE	MN-PCE	MN-NCE
M1	Control group (filtered water)	59.22 ± 3.34	1.38 ± 1.06		0.75 ± 0.88
M2	CP (30 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h before sacrifice)	58.23 ± 6.81	11.5 ± 6.71 ^e		0.5 ± 0.92
M3	OEP (1 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days)	67.26 ± 6.33 ^a	1.0 ± 0.75		0.5 ± 1.06
M4	OEP (1 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days) + CP (30 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h before sacrifice)	63 ± 10.10	22.63 ± 13.23 ^{b,i}		1.25 ± 1.48
M5	BLM (50 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h before sacrifice)	0*	0*		0*
M6	OEP (1 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days) + BLM (50 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h before sacrifice)	53.65 ± 8.38 ^b	5.37 ± 2.82 ^{j,k}		2.0 ± 1.41
M7	BLM (25 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h before sacrifice)	49.99 ± 11.88	2.25 ± 1.38		1.75 ± 1.03
M8	OEP (0.5 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days)	67.62 ± 9.66 ^c	1.0 ± 1.41		0.5 ± 0.75
M9	OEP (0.5 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days) + CP (30 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h before sacrifice)	57.84 ± 7.31	9.25 ± 4.71		1.87 ± 1.95
M10	OEP (0.5 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days) + BLM (25 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h before sacrifice)	51.01 ± 6.56 ^d	2.75 ± 0.88 ^l		0.63 ± 0.74 ^o
M11	BLM (10 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h before sacrifice)	59.07 ± 2.28	8.25 ± 3.24 ^m		1.37 ± 1.18
M12	OEP (0.5 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days) + BLM (10 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h before sacrifice)	65.37 ± 6.77 ^{e,f}	5.37 ± 1.50 ⁿ		1.62 ± 1.59

MN-PCE and MN-NCE - micronucleus test results for PCE and NCE, respectively. The results are expressed as the mean ± SD. *Extensive cell lysis was seen in bone marrow, with few cells and no reticulocytes. ^ap = 0.0117 compared to M1. ^bp = 0.0003 compared to M5. ^cp = 0.0460 compared to M1. ^dp = 0.01003 compared to M1. ^ep = 0.0357 compared to M1. ^fp = 0.0006 compared to M1. ^gp = 0.0309 compared to M2. ^hp = 0.0006 compared to M1. ⁱp = 0.0009 compared to M1. ^jp = 0.0172 compared to M1. ^kp = 0.0006 compared to M1. ^lp = 0.0009 compared to M1. ^mp = 0.0332 compared to M7.

PBS (Gibco BRL) at 37 °C and pipetted onto a microscope slide pre-coated with a layer of normal melting point agarose. This mixture was allowed to set at 4 °C for 10 min and the slides then immersed in a freshly prepared cold (4 °C) lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris and 1% lauroyl sarcosine, and the pH adjusted to pH 10.0-10.5 with NaOH; 1% Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide were added immediately before use) at 4 °C for 1 h. After lysis, the slides were placed in an electrophoretic tank containing 300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13.0 for 30 min, and electrophoresis was then done at 25 V, 350 mA for 40 min. Soon after neutralization (3 x 5 min in 0.4 M Tris, pH 7.5 at 4 °C), the slides were stained with ethidium-bromide (20 µg/mL), fixed in 100% ethanol for 5 min and analyzed with a Zeiss Axioskop 2 fluorescence microscope (filter 510-560 nm, barrier filter 590 nm) with a final magnification of 400x. All of the slides were prepared and analyzed in duplicate.

SCGE analysis: One hundred comets on each slide were scored visually and assigned to classes 0-4, as proposed by Collins (1995). Nucleoids with bright heads and no apparent tails were assigned to category 0, whereas comets with very small heads and long, diffuse tails were assigned to category 4. Comets with intermediate features between classes 0 and 4 were assigned to classes 1, 2 and 3. The number of comets in each category was counted and the average DNA damage (DD, expressed in arbitrary units, a.u.) was calculated according to Jalonszynski *et al.* (1997), as follows:

$$DD = \frac{n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4}{\sum \frac{100}{100}}$$

where n_1 - n_4 = the number of comets in categories 1-4, and Σ = the sum of all comets, including category 0.

In vivo antioxidant assay: thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) test

For the TBARS test, six groups (T1-T6) of eight mice each (4 males, 4 females) were used, as follows:

T1: Female control group (filtered water only, by gavage, daily, for 10 days)

T2: Male control group (filtered water only, by gavage, daily, for 10 days)

T3: Females treated with OEP (0.5 mL kg⁻¹, by gavage, daily for 10 days)

T4: Males treated with OEP (0.5 mL kg⁻¹, by gavage, daily for 10 days)

T5: Females treated with AEP (1.0 mL kg⁻¹, by gavage, daily for 10 days)

T6: Males treated with AEP (1.0 mL kg⁻¹, by gavage, daily for 10 days)

The TBARS assay was done according to Wasowicz *et al.* (1993), with slight modification. The TBA solution

Table 2 - Comet assay of peripheral leukocytes from Swiss white mice treated orally with an organic (OEP, 0.5 mL kg⁻¹) or aqueous (AEP, 1 mL kg⁻¹) extract of pequi (*Caryocar brasiliense*) fruit pulp, alone or with bleomycin (BLM, single injection, i.p.) or cyclophosphamide (CP, two injections, i.p.).

Group	Treatment	Comet classes (mean±SD)					Mean±SD of DD
		0	1	2	3	4	
C1	Control group (filtered water)	11.62 ± 5.34	61.25 ± 18.7	22 ± 10.4	4.75 ± 5.6	0.38 ± 0.52	121 ± 20.89
C2	CP (30 mg kg ⁻¹ , i.p., 48 and 24 h before sacrifice)	3.63 ± 2.88	6.63 ± 4.84	10.38 ± 6.80	31.88 ± 12.45	47.63 ± 13.75	313.5 ± 26.91 ^a
C3	OEP (0.5 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days)	12 ± 7.98	46 ± 20.78	26.29 ± 8.03	5.57 ± 8.55	9.57 ± 18.61	171.13 ± 68.18
C4	OEP (0.5 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days) + CP (30 mg kg ⁻¹ , i.p., 48 and 24 h before sacrifice)	21 ± 10.40	41.5 ± 24.57	14.88 ± 9.73	14.5 ± 15.67	7.5 ± 9.75	144.75 ± 57.22 ^b
C5	BLM (25 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h before sacrifice)	4.29 ± 2.81	36.5 ± 12.99	47 ± 13.53	13.75 ± 10.36	2.13 ± 3.44	180.25 ± 39.96 ^c
C6	OEP (0.5 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days) + BLM (25 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h before sacrifice)	8.38 ± 6.74	39 ± 13.42	41.5 ± 15.48	9.25 ± 6.78	2.0 ± 2.98	157.75 ± 27.03 ^d
C7	AEP (1 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days)	9.75 ± 7.06	39.88 ± 13.91	29.88 ± 14.09	12.38 ± 14.94	8.13 ± 7.07	169.25 ± 33.13
C8	AEP (1 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days) + CP (30 mg kg ⁻¹ , i.p., 48 and 24 h before sacrifice)	2.0 ± 1.85	68 ± 10.81	21.88 ± 9.49	5.13 ± 3.76	3.0 ± 3.38	139.13 ± 16.57 ^e
C9	AEP (1 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days) + BLM (25 mg kg ⁻¹ , i.p., 24 h before sacrifice)	6.13 ± 6.10	62.5 ± 16.48	27.63 ± 13.64	1.63 ± 2.26	2.13 ± 3.09	131.13 ± 14.29 ^{f,g}

^ap = 0.0008 compared to C1. ^bp = 0.0008 compared to C2. ^cp = 0.0016 compared to C1. ^dp = 0.0134 compared to C1. ^ep = 0.0008 compared to C2. ^fp = 0.0273 compared to C6. ^gp = 0.0023 compared to C5.

was prepared by dissolving TBA (Merck; final concentration 29 mmol/L) in acetic acid (8.75 mol/L; Merck). The stock standard solution of MDA was prepared by dissolving 480 µL of 1,1,3,3-tetraethoxypropane (Sigma) in 100 mL of ethanol (Merck). Immediately before use, the solution was diluted in Milli-Q water to yield a working solution of 10 µmol/L. The other reagents for the assay were purchased from Sigma (n-butanol) or Merck (EDTA, glutathione - GSH, and hydrochloric acid). Working aqueous solutions of EDTA (67.3 mmol/L) and GSH (32.5 mmol/L) were prepared freshly immediately before use (to avoid GSH oxidation).

Blood was collected by cardiac puncture using a insulin syringe containing EDTA as anticoagulant. After centrifugation (1500 x g, 10 min, 4 °C), the plasma was carefully removed and EDTA and GSH were added to final concentrations of 1.34 mmol/L and 0.65 mmol/L, respectively. The samples were then quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until used.

For the TBARS test, 50 µL of plasma or an equal volume of MDA working standard was added to 10 mL glass tubes containing 1 mL of Milli-Q water, followed by 1 mL of solution containing TBA (29 mmol/L) in acetic acid (pH of the reaction mixture, 2.4-2.6), mixing, and heating in a water bath for 1 h at 95° -100 °C. The samples were then cooled and 25 µL of 5 mol/L HCl was added (final pH 1.6-1.7), followed by extraction with 3.0 mL of n-butanol and vortex mixing for 30 s. The butanol phase was separated by centrifugation (1500 x g, 10 min) and its fluorescence was measured with a Jasco FP-777 spectrofluoro-

meter (excitation: 525 nm, emission: 547 nm). A standard curve was prepared with MBA (0-0.15 µmol/L).

Statistical analysis

The results were expressed as the mean ± SD. Statistical comparisons were done by using the Mann-Whitney U-test, with p < 0.05 indicating significance.

Results

Anticlastogenic and antigenotoxic assays

Micronucleus (MN) test

Neither of the doses of OEP (1 mL kg⁻¹ - group M3 or 0.5 mL kg⁻¹ - group M8) had any clastogenic effect on mouse bone marrow cells when compared with the control group (M1) (Table 1). However, the cellular proliferation index in mouse bone marrow cells, expressed as the percentage of PCE, increased in groups M3 and M8 (p = 0.0117 and p = 0.0460, respectively). There was no significant difference in the frequencies of MN-PCE (p = 0.5780), MN-NCE (p = 0.7004) and the cellular proliferation index (p = 0.9163) between groups M3 and M8. Cyclophosphamide (30 mg kg⁻¹, group M2) increased the frequency of MN-PCE, indicating this drug's clastogenic effect. Concomitant treatment with OEP (0.5 mL kg⁻¹, group M9) did not significantly affect the percentage of PCE compared to M2. In contrast, concomitant treatment with OEP (1 mL kg⁻¹, group M4) increased the frequency of MN-PCE to a greater extent than seen with CP or OEP alone (p = 0.0309).

Bleomycin (50 mg kg⁻¹; group M5) was clearly cytotoxic and caused cellular lysis (no erythroblasts were seen). At a dose of 25 mg kg⁻¹, bleomycin did not significantly alter the frequency of MN-PCE (group M7 vs. M1), but caused significant induction at 10 mg kg⁻¹ (group M11), indicating a clastogenic effect on these cells. Comparison of groups M5 and M6 showed that OEP (1 mL kg⁻¹) clearly protected bone marrow cells against bleomycin (50 mg kg⁻¹)-induced lysis ($p = 0.0003$ for MN-PCE, $p = 0.0011$ for MN-NCE and $p = 0.0003$ for %PCE). On the other hand, the combination of OEP (0.5 mL kg⁻¹) + bleomycin (25 mg kg⁻¹) (group M10) did not significantly affect MN-PCE, but reduced MN-NCE when compared with group M7 ($p = 0.0332$). Although the combination OEP (0.5 mL kg⁻¹) + bleomycin (10 mg kg⁻¹) (group M12) did not significantly decrease MN-PCE when compared with group M11, it significantly increased ($p = 0.0357$) the %PCE relative to the latter group.

Single-cell gel electrophoresis assay (SCGE - comet assay)

Table 2 shows the results of the comet assay in peripheral blood leukocytes of mice treated with OEP (0.5 mL kg⁻¹; group C3) and AEP (1 mL kg⁻¹; group C7). Neither OEP (C3) nor AEP (C7) significantly affected the DNA damage (DD) compared to group C1 (negative control), indicating that the extracts had no genotoxic effect in these cells. Likewise, there was no significant difference between C3 and C7. CP (30 mg kg⁻¹; C2) and BLM (25 mg kg⁻¹; C5) were significantly genotoxic when compared with C1 ($p = 0.0008$ and $p = 0.0016$, respectively). However, there was no significant difference between C1 and C4 (OEP 0.5 mL kg⁻¹ + CP 30 mg kg⁻¹) or C8 (AEP 1 mL kg⁻¹ + CP 30 mg kg⁻¹), indicating that at the doses tested OEP and AEP were efficient in protecting cells against the genotoxicity of CP (30 mg kg⁻¹). Comparison of C2 with C4 and C8 corroborated this protective effect ($p = 0.0008$ in both cases), although there were no significant differences between C4 and C8. When group C1 was compared with C6 (OEP 0.5 mL kg⁻¹ + BLM 25 mg kg⁻¹) or C9 (AEP 1 mL kg⁻¹ + BLM 25 mg kg⁻¹), only AEP showed significant protection ($p = 0.0134$). Similar protection was seen in the

comparison of C6 with C9 ($p = 0.0273$) and C5 with C9 ($p = 0.0023$), indicating that AEP provided greater protection than OEP against bleomycin (25 mg kg⁻¹)-induced DNA damage; there was no difference between C5 (BLM 25 mg kg⁻¹) and C6.

Antioxidant activity (TBARS assay)

There was no significant difference in the TBARS levels of female (group T1) and male (group T2) mice (Table 3). There were also no significant differences between T1 and T3, T3 and T5 or T4 and T6. However, mice treated with AEP showed significant lipid peroxidation ($p = 0.0248$ for T1 vs. T5, and $p = 0.0001$ for T2 vs. T6), indicating that AEP (1 mL kg⁻¹) enhanced oxidative stress in both sexes, especially in males. A similar result was observed between control males and males treated with OEP (0.5 mL kg⁻¹) (T2 vs. T4, $p = 0.00002$). Thus, at the doses used, neither of the extracts protected males against lipid peroxidation.

Discussion

Micronuclei in interphase cells result from chromosomal breaks or chromosomal lagging (Schmid, 1975; Natarajan and Obe, 1982; FDA, 2000), and DNA damage to eukaryotic organisms or individual cells is frequently assessed with the comet assay (Henderson *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 2004). In the present study, the MN test and comet assay showed that OEP (0.5 mL kg⁻¹ or 1 mL kg⁻¹) had no clastogenic or genotoxic effect on mouse bone marrow cells or peripheral blood lymphocytes, a finding that corroborated the MN test results reported by Khouri *et al.* (2007).

Bleomycin sulphate (BLM), a radiomimetic glycopeptide routinely used in cancer chemotherapy, produces MN in human, rat and mouse cells, mainly through oxidative damage to DNA (Erexson *et al.*, 1995). Bleomycin-mediated DNA degradation requires the presence of a redox-active metal ion such as Fe²⁺ or Cu²⁺, as well as molecular oxygen, to produce reactive oxygen species (ROS) that are toxic and mutagenic in a variety of biological models *in vitro* and *in vivo* (Hoffmann *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1995; Erexson *et al.*, 1995; Hecht, 2000).

Table 3 - Lipid peroxidation (TBARS levels) in plasma of Swiss white mice treated orally an organic (OEP, 0.5 mL kg⁻¹) or aqueous (AEP, 1 mL kg⁻¹) extract of pequi (*Caryocar brasiliense*) fruit pulp.

Group	Treatment	Fluorescence (mean±SD)	MDA (μmol/L) (mean±SD)
T1	Female control group (filtered water)	311.16 ± 41.26	0.023 ± 0.003
T2	Male control group (filtered water)	307.9 ± 18.17	0.023 ± 0.001
T3	Females treated with OEP (0.5 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days)	337.31 ± 39.59	0.025 ± 0.003
T4	Males treated with OEP (0.5 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days)	421.36 ± 46.29 ^a	0.031 ± 0.003
T5	Females treated with AEP (1 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days)	345.0 ± 28.42 ^b	0.026 ± 0.002
T6	Males treated with AEP (1 mL kg ⁻¹ , p.o., daily for 10 days)	392.2 ± 39.95 ^c	0.029 ± 0.003

^a $p = 0.00002$ compared to T2. ^b $p = 0.0248$ compared to T1. ^c $p = 0.0001$ compared to T2.

As shown here, the prior administration of OEP (1 mL kg^{-1}) clearly protected mouse bone marrow cells against lysis induced by BLM (50 mg kg^{-1}); a lower dose of OEP (0.5 mL kg^{-1}) also protected against the natural clastogenic effects, although the decrease in MN-NCE was not significant. Hence, both of the OEP doses used offered some protection against the clastogenicity of BLM. This finding was corroborated by the comet assay. AEP (1 mL kg^{-1}) offered greater protection against BLM (25 mg kg^{-1})-induced DNA damage than OEP (0.5 mL kg^{-1}); the reduction in DNA damage by the latter was not significant.

Since the cytotoxicity of BLM involves the production of ROS (Hoffmann *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1995; Erxson *et al.*, 1995; Hecht, 2000), our results suggest that the protection against BLM-induced oxidative damage to DNA was mediated by antioxidant components in the *C. brasiliense* extracts. Indeed, previous studies have indicated that compounds with antioxidant activities may modulate BLM-induced genotoxicity (Povirk and Austin, 1991; Povirk, 1996; Khouri *et al.*, 2007). The results of the comet assay corroborated those of the MN test and showed that the ability of the two extracts to protect against BLM was limited by the dose of extract used. The greater protection seen with AEP probably reflected its higher content of antioxidants compared to that of OEP at the doses used.

Chemotherapy with CP can cause secondary tumors in humans by activating hepatic mixed function oxidases. Phosphoramidate mustard, the major antineoplastic metabolite of CP, is an alkylating agent that induces a variety of changes in DNA (IARC, 1981; Krishna *et al.*, 1987) through its ability to form labile covalent DNA adducts and cross-linkages (Anderson *et al.*, 1995).

Compounds with antioxidant properties, such as vitamin C (present in AEP) and β -carotene (present in OEP) can have antioxidant and oxidant effects that are dose-dependent (Antunes and Takahashi, 1999; Paolini *et al.*, 2003). This two-sided or Janus effect reflects the dual nature of certain chemical substances such as antioxidants and drugs used to treat cancer. As shown here, OEP had a Janus effect: at 0.5 mL kg^{-1} OEP effectively protected cells against the genotoxicity of CP (comet assay) without significantly protecting against chromosomal aberrations (MN test) whereas at 1 mL kg^{-1} OEP increased the frequency of MN in the presence of CP (30 mg kg^{-1}). Similar results were reported by Khouri *et al.* (2007) who studied the combination of AEP (1 mL kg^{-1}) plus CP (33 mg kg^{-1} or 66 mg kg^{-1}).

With the treatment schedule used here, it was not possible to determine whether the protection offered by the extracts was related to a reduction in the efficacy of BLM or CP (by affecting the pharmacokinetics of these compounds), or to a direct effect on the cells themselves. However, previous studies have shown that natural antioxidants can prevent the oxidation of biomolecules, including DNA, without decreasing the effectiveness of chemotherapeutic

compounds. According to Liu *et al.* (2003) and Berger (2005), an antioxidant dietary supplement can reduce the level of oxidative damage to DNA and protect normal cells against the adverse side-effects of some chemotherapeutic agents. Nutritional therapy with antioxidants concomitant with chemotherapy reduces the frequency and severity of adverse effects associated with many drugs in cancer patients, thereby allowing the treatment to be continued (the toxicity of anti-cancer drugs is a frequent limitation to their extended use) (Borek, 2004). As shown here, OEP and AEP protected against oxidative DNA damage caused by BLM or CP, which agrees with the ability of antioxidants to inhibit chemical mutagenesis *in vivo* and with studies showing that plant extracts contain antioxidants that can protect DNA against damage by ROS (Cano *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Owen *et al.*, 2003; Khouri *et al.*, 2007). However, our results indicate that this protection is related to the dose of extract used.

Organisms are constantly exposed to the action of ROS and the presence of antioxidants in the diet can protect against oxidative processes (Ferreira and Matsubara, 1997; Degáspari and Waszczynskyj, 2004). In contrast, the use of nutritional supplements with antioxidant properties is controversial. Antunes and Takahashi (1999) showed that vitamin C had antimutagenic activity only at certain concentrations; at high concentrations this compound did not protect against mutations but was cytotoxic to lymphocytes. Paolini *et al.* (2003) reported that β -carotene prevented oxidative lesions in DNA but stimulated cytochrome P450 enzymes, leading to the bioactivation of pro-carcinogenic agents such as those found in cigarette smoke. In agreement with these studies, the OEP of pequi fruit may contain high concentrations of many antioxidant compounds capable of exerting a pro-oxidative effect and increasing DNA lesions when combined with CP or BLM.

The TBARS assay is a simple, reliable and reproducible fluorometric method for assessing lipid peroxidation in serum, and is based on the reaction between malondialdehyde (MDA), a byproduct of lipid peroxidation, and thiobarbituric acid. Oxidative attack of cellular components by ROS is a common phenomenon in the pathogenesis of several human diseases, including cardiovascular diseases (*e.g.*, atherosclerosis), diabetes, various liver disorders, and inflammatory rheumatic diseases. For this reason, there is considerable interest in the quantification of MDA in body fluids or cells (Wasowicz *et al.*, 1993; Jentzsch *et al.*, 1996). The TBARS results obtained here indicate that high doses of plant extracts rich in antioxidant compounds can produce unexpected effects. Since the 1980s, there has been a considerable increase in the search for natural antioxidants that can be included in the diet as a substitute for synthetic antioxidants (Degáspari and Waszczynskyj, 2004). The TBARS results obtained here in female mice suggest that the antioxidant properties of OEP

make this product a potentially useful dietary supplement, in addition to its other nutritional properties.

The anticlastogenic and antigenotoxic activities of OEP seen in this study were attributable to its content of antioxidants. However, the comet assay and MN test results obtained here and by Khouri *et al.* (2007) indicate that, at the doses used, AEP was more effective than OEP in protecting DNA against damage by clastogenic agents. However, the ability of OEP and AEP to protect against BLM- or CP-induced oxidative damage to DNA depended on the dose of extract used.

Acknowledgments

This work was supported by the University of Brasília and Scientific and Technological Enterprises Foundation (FINATEC).

References

- Almeida SP de (1998) Frutas nativas do cerrado: Caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: Sano SM and Almeida SP de (eds) Cerrado: Ambiente e Flora. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, pp 247-285.
- Almeida SP de and Silva JA (1994) Pequi e Buriti - Importância Alimentar para a População dos Cerrados. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, 38 pp.
- Anderson D, Bishop JB, Garner RC, Ostrosky-Wegman P and Selby PB (1995) Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mut Res* 330:115-181.
- Antunes LM and Takahashi CS (1999) Protection and induction of chromosomal damage by vitamin C in human lymphocytes cultures. *Teratog Carcinog Mutagen* 19:53-59.
- Azevedo-Meleiro CH and Rodriguez-Amaya DB (2004) Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *JFCA* 17:385-396.
- Barbosa RCMV and Amante ER (2005) Farinha da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*). http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/tecnologia_de_alimentos/015.htm (October 29, 2006)
- Berger MM (2005) Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin Nutr* 24:172-183.
- Boletim Informativo UFMG n. 1511 (2005) Os Frutos da Genética. <http://www.ufmg.br/boletim/bol1511/sexta.shtml> (May 31, 2007).
- Borek C (2004) Dietary antioxidants and human cancer. *Integ Cancer Ther* 3:333-341.
- Cano A, Acosta M and Arnao MB (2003) Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity changes during on-vine ripening of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Post Biol Technol* 28:59-65.
- Degáspari CH and Waszczynskyj N (2004) Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Vis Acad* 5:33-40.
- Dusinská M, Kasimirová A, Barancoková M, Beno M, Smotkova B, Horská A, Wsolova JL and Collins AR (2003) Nutritional supplementation with antioxidants decreases chromosomal damage in humans. *Mutagenesis* 18:371-376.
- Erexson GL, Bryant MF, Kwanyuen P and Kligerman AD (1995) Bleomycin sulfate-induced micronuclei in human, rat and mouse peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 25:31-36.
- FDA (U.S. Food and Drug Administration) (2000) Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. Redbook 2000: IV.C.1.d. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. <http://www.cfsan.fda.gov/~redbook/redv1d.html> (June 16, 2007).
- Ferreira ALA and Matsubara LS (1997) Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras* 43:61-68.
- García O, Mandina T, Lamadrid AI, Diaz A, Remigio A, Gonzalez Y, Piloto J, Gonzalez JE and Alvarez A (2004) Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mut Res* 556:25-34.
- Hecht SM (2000) Bleomycin: New perspectives on the mechanism of action. *J Nat Prod* 63:158-168.
- Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner C and Windebank S (1998) The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis* 13:89-94.
- Hoffmann GR, Colyer SP and Littlefield G (1993) Induction of micronuclei by bleomycin in G₀ human lymphocytes: I. Dose-response and distribution. *Environ Mol Mutagen* 21:130-135.
- IARC (1981) Some antineoplastic and immunosuppressive agents. In: Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, v. 26. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp 165-202.
- Jaloszynski P, Kujawski M, Czub-Swierczek M, Markowska J, Szyfter K (1997) Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. *Mutat Res* 385:223-233.
- Jentzsch AM, Bachmann H, Furst P and Biesalski HK (1996) Improved human analysis of malondialdehyde in body fluids. *Free Radic Biol Med* 20:251-256.
- Khouri J, Resck IS, Poças-Fonseca M, Souza TMM, Pereira LO, Oliveira ABB and Grisolia CK (2007) Anticlastogenic potential and antioxidant effects of the aqueous extract of pulp from "pequi" (*Caryocar brasiliense* Camb). *Gen Mol Biol* 30:442-448.
- Kong Q and Lillehei KO (1998) Antioxidant inhibitors for cancer therapy. *Med Hypot* 51:405-409.
- Krishna G, Nath J, Peterson M and Ong T (1987) Cyclophosphamide-induced cytogenetic effects in mouse bone marrow and spleen cells *in vivo* and *in vivo/in vitro* assays. *Teratog Carcinog Mutagen* 7:183-195.
- Lee PJ, Min BS, Na RB, Na MK, Lee SM, Lee HK, Kim JG, Bae KH and Kang SS (2003) Stilbenes from the roots of *Pleuropterus ciliinervis* and their antioxidant activities. *Phytochemistry* 64:759-763.
- Liu X, Zhao J and Zheng R (2003) DNA damage of tumor-associated lymphocytes and total antioxidant capacity in cancerous patients. *Mutat Res* 539:1-8.
- Martino-Roth MG, Viégas J and Roth DM (2003) Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genet Mol Res* 2:410-417.
- Natarajan AT and Obe G (1982) Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: Cytogenetic assays. In: John A Heddle (ed) *Mutagenicity - New Horizons in Genetic Toxicology*. Academic Press, New York, pp 171-212.

- Oliveira MNS, Gusmão EL, Nascimento OS, Simões MOM, Ribeiro LM and Dias BAS (2006) Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Rev Bras Frutic 28:380-386 (Abstract in English).
- Owen RW, Haubner R, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B and Bartsch H (2003) Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic flavonoid compounds in brined olive drupes. Food Chem Toxicol 41:703-717.
- Paolini M, Abdel-Rahman SZ, Sapone A, Pedulli GF, Perocco P, Cantelli-Forti G and Legator MS (2003) β -carotene: A cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? Mutat Res 543:195-200.
- Povirk LF (1996) DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: Bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. Mutat Res 355:71-89.
- Povirk LF and Austin MJF (1991) Genotoxicity of bleomycin. Mutat Res 257:127-143.
- Ramos MIL, Umaki MCS, Hiane PA and Ramos-Filho MM (2001) Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitâmnicos "A" da polpa de piqui (*Caryocar brasiliense* Camb.). B CEPPA 19:23-32.
- Santos BR, Paiva R, Dombroski JLD, Martinotto C, Nogueira RC and Silva AAN (2005) Pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.): Uma espécie promissora do cerrado brasileiro. UFLA. http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol_64.pdf (October/2006).
- Santos HS and Cruz WMS (2001) A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. Rev Bras Cancerol 47:303-308 (Abstract in English).
- Schmid W (1975) The micronucleus test. Mutat Res 31:9-15.
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem 215:213-219.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schenfelder EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175:184-191.
- Tice RR (1995) The single cell gel/comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips DH and Venitt S (eds) Environmental Mutagenesis. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp 315-339.
- Tseng CF, Lin CC, Huang HY, Liu HC and Mao SJT (2004) Antioxidant role of human haptoglobin. Proteomics 4:2221-2228.
- Wasowicz W, Nève J and Peretz A (1993) Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. Clin Chem 39:2522-2526.

Associate Editor: Catarina S. Takahashi

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

10.4. Anexo IV – Explicação do Termo de Consentimento



LABORATÓRIO DE GENÉTICA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Nº _____

EXPLICAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO

Título do estudo

“Avaliação dos efeitos antigenotóxicos, antioxidantes e farmacológicos de extratos da polpa do fruto do Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb)”

Projeto de doutorado da aluna Ana Luisa Miranda-Vilela do curso de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília (UnB), coordenado pelo profº Dr. Cesar Koppe Grisolia – Deptº de Genética e Morfologia – Laboratório de Genética – Universidade de Brasília.

Informações sobre a sua participação

A procura por suplementos vitamínicos naturais, principalmente aqueles com propriedades antioxidantes, que previnem lesões no material genético, e consequentemente reduz o risco de câncer, tem aumentado muito nos últimos anos. Já está cientificamente demonstrado que o uso de antioxidantes também diminui o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e distúrbios inflamatórios crônicos, entre outras.

O pequi é muito conhecido na culinária regional e tem um alto valor nutricional. O óleo de pequi, além de conter suplementos antioxidantes, é também usado na medicina popular para combater diversos tipos de doenças, principalmente aquelas do trato respiratório, além de ser usado também para curar problemas oftalmológicos (da visão) relacionados à deficiência de vitamina A. Entretanto, devido ao seu sabor peculiar, grande parcela da população não o aprecia como alimento. Atualmente, através de técnicas farmacêuticas, pode-se suavizar esse sabor tornando-o mais aceitável pela população em geral.

As técnicas apresentadas para o desenvolvimento do produto já são conhecidas e validadas cientificamente. O caráter inovador do projeto baseia-se no fato de estarmos apresentando um fruto típico do cerrado, muito conhecido na culinária, mas agora com uma outra propriedade: suplemento vitamínico antioxidante na forma de extrato puro acondicionado em cápsulas gelatinosas e com o sabor suavizado ou ligeiramente mascarado através de técnicas farmacêuticas.

As populações alvo seriam atletas, que têm grande desgaste físico durante as suas atividades, indivíduos que de algum modo estejam sob alguma condição de estresse físico, ou mental, pessoas da terceira idade que necessitam de maior aporte vitamínico, entre outras.

Os voluntários nesse estudo serão submetidos a uma suplementação diária durante 14 dias com o extrato puro de óleo de pequi, encapsulado de acordo com os procedimentos da

técnica farmacêutica, sob a responsabilidade da Farmácia de Manipulação "Farmacotécnica", empresa já bem estabelecida no Distrito Federal.

Objetivos do estudo:

1. Verificar a capacidade antioxidante do extrato de pequi, medindo componentes do sangue (plasma sanguíneo).
2. Estudar as propriedades das cápsulas de pequi em proteger o material genético (DNA).
3. Verificar se as cápsulas de pequi melhoram os componentes do sangue.
4. Verificar se o esforço físico modifica a estrutura da musculatura e se as cápsulas de pequi podem proteger os indivíduos contra as lesões musculares e cardíacas provenientes de alto esforço físico.
5. Procurar uma associação entre a resistência dos indivíduos aos esforços físicos com sua aptidão natural (genética).
6. Analisar componentes do sangue para avaliar a possibilidade de desenvolvimento futuro de pressão alta.

Benefícios:

Ao final do estudo, apresentaremos aos participantes voluntários interessados, os resultados dos exames realizados. São dados bastante informativos sobre a saúde do cidadão. Qualquer informação importante que surgir durante a sua participação no estudo e que possa contribuir para o seu melhor estado de saúde será levada imediatamente ao seu conhecimento.

Caso for constatado algum desvio de normalidade nesses exames, o voluntário será imediatamente informado e aconselhado a buscar tratamento médico específico.

Possíveis riscos:

1. O pequi já é amplamente ingerido através da culinária e não há relato de intolerância ou alergia. Caso algum voluntário venha a sentir algum tipo de desconforto ao ingerir as cápsulas, ele deverá informar imediatamente ao coordenador do projeto, podendo assim ser desligado do grupo.
2. Desconforto na coleta endovenosa de sangue, que será realizada em dois momentos distintos, num intervalo de tempo de 15 dias.

Outras informações:

1. Duração da sua participação: 15 dias.
2. Não haverá implicação na mudança nos hábitos de vida em virtude da participação nesse estudo.
3. Compromisso com o sigilo da identidade do voluntário: os registros da participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento somente dos participantes do projeto. Cada voluntário receberá um número.

Maiores esclarecimentos:

1. Caso você necessite de maiores esclarecimentos, entre em contato com o profº Cesar Koppe Grisolia através dos telefones (61) 3307-2161 ou 9983-1747 ou Ana Luisa Miranda-Vilela através dos telefones 3307-2161 e 9965-7535.
2. Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte aos pesquisadores antes de assinar o termo de consentimento.

10.5. Anexo V – Termo de Consentimento



LABORATÓRIO DE GENÉTICA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Nº _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, PÓS-INFORMAÇÃO

O abaixo assinado, _____ declara ter sido plenamente esclarecido, lido e ouvido o presente termo de responsabilidade que lhe informa estar ciente do seguinte:

- a) Que pelo presente documento concordo em participar voluntariamente do projeto “**Avaliação dos efeitos antigenotóxicos, antioxidantes e farmacológicos de extratos da polpa do fruto do Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb)**”, coordenado pelo Profº Dr. Cesar Koppe Grisolia e executado pela aluna de doutorado do Curso de Pós Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília (UnB), Ana Luisa Miranda-Vilela, do Laboratório de Genética - Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, com a parceria da Empresa Farmacotécnica e dos Laboratórios Sabin, respectivamente, farmácia de manipulação e laboratório de análises clínicas bem estabelecidos no Distrito Federal.
- b) Que minha participação no projeto implicará na retirada de sangue de uma das veias do antebraço em dois momentos distintos, sendo que este material será utilizado com a finalidade de avaliação de hemograma e lipidograma, integridade das musculaturas esquelética e cardíaca, teste de peroxidação lipídica e estudos do material genético (ver item **Objetivos do Estudo**).
- c) Que esses procedimentos são usuais na pesquisa genética, não implicando em qualquer tipo de risco de natureza ética ou para a saúde.
- c) Que minha participação implicará também na ingestão diária de cápsulas de pequi durante 14 dias consecutivos, bem como no fornecimento de dados pessoais como idade, sexo, hábitos de vida, uso de qualquer tipo de medicação, estado de saúde, horas de sono, dieta etc, na forma de questionário.
- e) Que minha participação poderá implicar também na medida de pressão sanguínea, altura e pesagem em balança digital.
- f) Que as informações aqui obtidas serão mantidas sob sigilo, sendo que cada participante poderá ter acesso às informações que lhe cabem no momento em que for solicitado.

g) Que os dados gerados serão utilizados exclusivamente em pesquisas científicas e divulgados sob a forma de relatórios, artigos científicos ou para o público leigo apenas de forma generalizada (global), não havendo, portanto, a divulgação de dados individuais.

h) Que a minha participação no projeto é totalmente voluntária, não acarretando ônus a qualquer uma das partes, em qualquer tempo.

i) Que apenas terei como benefícios pessoais ao participar desta pesquisa, os resultados dos exames analisados, com consequente avaliação da saúde geral, além da oportunidade de ajudar a ciência a entender melhor o papel dos produtos naturais sobre a saúde do homem.

j) Que em caso de dúvidas ou esclarecimentos poderei contatar diretamente os responsáveis pelo projeto, nos endereços eletrônicos ou telefones listados abaixo.

k) Que a decisão em desistir do projeto poderá ser feita a qualquer tempo, mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento, bastando a comunicação prévia aos responsáveis pelo projeto.

Atesto o recebimento da cópia deste acordo, que é constituído pelos termos de explicação e de consentimento, estou plenamente esclarecido sobre minha participação no projeto e aceito as condições estipuladas.

Brasília, _____ de _____ de 200 ____

Assinatura: _____

Coordenador do Projeto: Profº Dr. Cesar Koppe Grisolia

Deptº de Genética e Morfologia – Laboratório de Genética – Universidade de Brasília

Fones: (61) 3307-2161, 9983-1747

E-mail: grisolia@unb.br

Aluna de doutorado: Ana Luisa Miranda-Vilela

Deptº de Genética e Morfologia – Laboratório de Genética – Universidade de Brasília

Fones: (61) 3307-2161, 9965-7535

E-mail: analuismv@uol.com.br

Dados Clínicos:

- Tabagismo: ☐ Não ☐ Sim (caso positivo, responder abaixo):
 - ☐ N° atual de cigarros por dia: _____
 - ☐ Tempo de tabagismo: _____ ☐ dias ☐ semanas ☐ meses ☐ anos
 - ☐ Parou de fumar há _____ ☐ dias ☐ semanas ☐ meses ☐ anos
- Uso de bebida alcoólica: ☐ Não ☐ Sim (caso positivo, responder abaixo):
 - ☐ Anual Especificar: _____
 - ☐ Mensal Especificar: _____
 - ☐ Semanal N° de vezes por semana: _____
- Uso de medicamentos e/ou outras drogas:
 - ☐ Não
 - ☐ Sim
 - Especificar quando possível: _____
 - Frequência e dose: _____
- Uso de anticoncepcional hormonal ou tratamento de reposição hormonal:
 - ☐ Não
 - ☐ Anticoncepcional
 - ☐ Tratamento de reposição hormonal
 - Frequência e dose: _____
- Uso de suplementos (vitaminas, sais minerais, aminoácidos etc):
 - ☐ Não
 - ☐ Sim
 - Especificar: _____
 - Frequência e dose: _____
- Submeteu-se a algum exame radiológico nos últimos 6 meses (raio-X, radioterapias ou exames com isótopo radioativo, ressonância)?
 - ☐ Não
 - ☐ Sim Frequência: _____
- Episódio de exposição acidental a substâncias químicas:
 - ☐ Não
 - ☐ Sim Frequência: _____
- Exposição ocupacional (no trabalho) a substâncias químicas:
 - ☐ Não
 - ☐ Sim Especificar: _____
- Tem ou já teve hepatite ou algum tipo de disfunção hepática?
 - ☐ Não
 - ☐ Sim Especificar: _____

- Tem algum tipo de anemia hereditária?
 - ☐ Não
 - ☐ Sim Especificar: _____
- Tem alergia ou algum tipo de doença crônica (rinite, asma, bronquite, anemia hereditária, hipertensão arterial ou outro tipo de doença cardiovascular, diabetes, gota, artrite, reumatismo, osteoporose etc)?
 - ☐ Não
 - ☐ Sim Especificar: _____
- Está gripado(a) ou apresenta algum outro tipo de infecção?
 - ☐ Não
 - ☐ Sim Especificar, se possível: _____
- Já fez ou costuma fazer check-up cardiológico?
 - ☐ Não
 - ☐ Sim Especificar frequência: _____
 - Resultado do check-up cardiológico:
 - ☐ Normal
 - ☐ Alterado Especificar alteração: _____
- Antecedentes familiares de anemia hereditária, hipertensão arterial ou outro tipo de doença cardiovascular, diabetes, câncer, gota, artrite, reumatismo, osteoporose ou algum outro tipo de doença crônica.
 - ☐ Não
 - ☐ Sim Especificar: _____
Grau de parentesco: _____
- Horas de sono por dia: _____
- Encontra-se sob situação de estresse em casa ou no trabalho?
 - ☐ Não
 - ☐ Sim
- Quantas vezes você treina ou se exercita por semana?
 - o Fora de época de competição _____
 - Tipo(s) de exercício físico: _____
 - N° de horas por dia: _____
 - Total por semana _____
 - o Em época de competição _____
 - Tipo(s) de exercício físico: _____
 - N° de horas por dia: _____
 - Total por semana _____
 - o ☐ Estou sem treinar há _____ ☐ dias ☐ semanas ☐ outro _____

- Participou de alguma competição recentemente (há menos de 1 mês)?
 - ☐ Não
 - ☐ Sim Especificar: _____
- Dieta básica durante a semana:
 - o N° de vezes que se alimenta por dia:
 - ☐ 3 (café da manhã, almoço e jantar)
 - ☐ 4 (café da manhã, almoço, lanche e jantar)
 - ☐ 6 (café da manhã, lanche, almoço, lanche, jantar e ceia)
 - ☐ outro Especificar _____
 - o Eespecificar abaixo a dieta básica:
 - Café da manhã:

 - Lanche:

 - Almoço:

 - Lanche:

 - Jantar:

 - Ceia:

 - o Dieta altera no período de competição
 - Especificar alteração:

10.7. Anexo VII – Valores de referência dos exames realizados nos Laboratórios Sabin.

1. Hemograma

Eritrograma				
	Homens	Mulheres	Crianças	Acima de 70 anos
Hemácias (milhões/mm ³)	4,50 a 6,10	4,00 a 5,40	4,07 a 5,37	3,90 a 5,36
Hemoglobina (g/dL)	13,0 a 16,5	12,0 a 15,8	10,5 a 14,0	11,5 a 15,1
Hematócrito (%)	36,0 a 54,0	33,0 a 47,8	30,0 a 44,5	33,0 a 46,0
VCM (fl = fentolitros)	80,0 a 98,0	80,0 a 98,0	70,0 a 86,0	80,0 a 98,0
HCM (pg = picogramas)	26,8 a 32,9	26,2 a 32,6	23,2 a 31,7	27,0 a 31,0
CHCM (g/%)	32,0 a 36,0	32,0 a 36,0	32,0 a 36,0	32,0 a 36,0
RDW (%)	12,0 a 14,5	12,0 a 14,5	12,0 a 14,5	12,0 a 14,5

Leucograma				
	Adultos		Crianças	
	(%)	(/mm ³)	(%)	(/mm ³)
Leucócitos	100	3700 a 11000	100	4000 a 15000
Linfócitos	20-50	740 a 5500	38-70	1520 a 10500
Bastonetes	0-5	0 a 550	0-6	0 a 450
Segmentados	40-70	1480 a 7700	30-64	1200 a 9600
Eosinófilos	0-5	0 a 550	0-5	0 a 750
Basófilos	0-2	0 a 220	0-2	0 a 300
Monócitos	1-10	37 a 1100	1-10	40 a 1500

Série plaquetária		
	Adultos	Crianças
Plaquetas (mil/mm ³)	140 a 450	140 a 500
VPM (fl)	6,8 a 12,6	6,8 a 12,6
Plaquetócrito (%)	0,18 a 0,29	0,18 a 0,29
PDW (%)	16,3 a 17,9	16,3 a 17,9

2. Dosagens Bioquímicas

Transaminase Oxalacética (TGO)	
(U/L)	Masculino: 15 a 40 U/L Feminino: 13 a 35 U/L
Transaminase Pirúvica (TGP)	
(U/L)	Masculino: 10 a 40 U/L Feminino: 07 a 35 U/L
CPK	
(UI/L)	até 190
PCR Ultra Sensível (mg/dL)	
Baixo risco	menor que 1,0
Médio risco	de 1,0 a 3,0
Alto risco	acima de 3,0

3. Perfil lipídico: valores de referência após jejum de 12 horas

Colesterol total (mg/dL)	
Entre 2 e 19 anos:	Inferior a 170
Acima de 20 anos:	
Ótimo	Inferior a 199
Limítrofe	200 a 239
Alto	Igual ou superior a 240
Triglicerídeos (mg/dL)	
Ótimo	Inferior a 150
Limítrofe	150 a 199
Alto	200 a 499
Muito alto	Igual ou superior a 500
Colesterol HDL (mg/dL)	
Valores desejáveis	Superior a 40
Colesterol LDL (mg/dL)	
Ótimo	Inferior a 100
Desejável	100 a 129
Limítrofe	130 a 159
Alto	160 a 189
Muito alto	Igual ou superior a 190
Colesterol VLDL (mg/dL)	
Desejável	< 30
Limítrofe	30 a 67
Aumentado	> 67