

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES**

TESE DE DOUTORADO

**Efeitos de uma dieta rica em flavonoides sobre o estresse oxidativo,
inflamação e perfil lipídico em pacientes submetidos à angioplastia
coronária com implante de stent: ensaio clínico randomizado**

MAGDA AMBROS CAMMERER

Porto Alegre, 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES**

**Efeitos de uma dieta rica em flavonoides sobre o estresse oxidativo,
inflamação e perfil lipídico em pacientes submetidos à angioplastia
coronária com implante de stent: ensaio clínico randomizado**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da UFRGS para obtenção do grau de Doutor.

MAGDA AMBROS CAMMERER

Orientador: Prof. Dr. Marco V. Wainstein

Porto Alegre, 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Cammerer, Magda Ambros

Efeitos de uma dieta rica em flavonoides sobre o estresse oxidativo, inflamação e perfil lipídico em pacientes submetidos à angioplastia coronária com implante de stent / Magda Ambros Cammerer. -- 2012. 100 f.

Orientador: Marco Wainstein.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. nutrição. 2. cardiologia. 3. estresse oxidativo. 4. antioxidantes. I. Wainstein, Marco, orient. II. Título.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Marco V. Wainstein pela eficiente orientação desse trabalho e incentivo constante.

Aos professores desse curso de pós-graduação pela qualidade do seu ensino.

Ao Doutor Sandro Cadaval Gonçalves pela inestimável colaboração.

Ao Doutor Michael Everton Andrades, pesquisador do Centro de Pesquisa Experimental e acadêmica Amanda Lopes pela realização dos testes laboratoriais.

Às enfermeiras, técnicos de enfermagem e secretárias da Unidade de Hemodinâmica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio na fase de coleta de dados.

A todos os acadêmicos da UFRGS e do Centro Universitário Metodista, do IPA, envolvidos no trabalho e em especial à nutricionista Ivana Behm Caberlon pela realização dos cálculos das dietas.

Ao meu esposo Fernando e minhas filhas Juliana e Isabella por todo o apoio emocional e compreensão nas minhas ausências.

E finalmente meu agradecimento aos pacientes anônimos, sem os quais, esse trabalho não seria possível.

SUMÁRIO

Revisão da Literatura.....	6
<i>Lista de figuras</i>	7
<i>Lista de tabelas</i>	8
<i>Lista de abreviaturas</i>	9
<i>Estresse oxidativo</i>	10
<i>Referências</i>	23
Hipótese conceitual.....	29
Objetivos.....	30
Artigo original (versão em português)	31
<i>Efeitos de uma dieta rica em flavonoides sobre o estresse oxidativo, inflamação e perfil lipídico em pacientes submetidos à angioplastia coronária com implante de stent: ensaio clínico randomizado</i>	
<i>Tabelas</i>	47
<i>Figuras</i>	54
Artigo original (versão em inglês).....	65
<i>The effects of a flavonoid-rich diet on oxidative stress, inflammation and lipid profile in patients submitted to coronary angioplasty with stent implantation: a randomized clinical trial</i>	
<i>Tables</i>	80
<i>Figures</i>	87
Termo de consentimento livre e esclarecido	98
Ficha de acompanhamento	101

REVISÃO DA LITERATURA

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 . Estrutura básica de um flavonoide	17
--	----

LISTA DE TABELAS

Tab 1. Classificação dos flavonoides e fontes alimentares	18
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	Catalase
DCV	Doença cardiovascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GST	Glutadiona S-transferase
HO ₂ ·	Radical hidroperoxil
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOOH	Radical peroxil
MUFA	Monounsaturated fatty acid
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase
NO	Óxido nítrico
.OH	Radical hidroxil
O ₂ ^{·-}	Ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio <i>singlet</i>
ONOO ⁻	Peróxido nitrito
PUFA	Poliunsaturated fatty acid
ROS	Espécie reativa de oxigênio
RNS	Espécie reativa de nitrogênio
RL	Radical livre
RSS	Espécie reativa de enxofre
RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido dismutase

ESTRESSE OXIDATIVO

As doenças cardiovasculares (DCV) são consideradas as principais causas de mortalidade nas populações de países desenvolvidos, portanto, é necessário controlar a proliferação dessas doenças para reduzir o número de mortes súbitas e os custos de intervenção¹. Radicais livres (RL), antioxidantes e cofatores são as três principais áreas que poderão contribuir para a redução do impacto das doenças e do processo de envelhecimento². O entendimento desses eventos na saúde podem ajudar a prevenir ou reduzir a incidência dessas e outras doenças e contribuir para uma melhor qualidade de vida².

Radical livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados, altamente ativos em reações químicas com outras moléculas. No sistema biológico os radicais livres são derivados de moléculas de oxigênio, nitrogênio e enxofre. Essas moléculas são partes ou grupos de moléculas denominadas espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*), espécies reativas de nitrogênio (RNS – *reactive nitrogen species*) e espécies reativas de enxofre (RSS – *reactive sulphur species*). As espécies reativas de oxigênio (ROS) incluem os radicais livres como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), o radical hidroxil (OH \cdot), o óxido nítrico e outras espécies reativas como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio *singlet* (1O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e o peróxido nitrito ($ONOO^{\cdot}$)³. Espécies reativas de nitrogênio são derivadas do óxido nítrico através da reação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para formar peróxido nitrito ($ONOO^{\cdot}$). As espécies reativas de enxofre (RSS) são facilmente formadas a partir de tióis em reação com ROS².

Os radicais livres apresentam diferentes mecanismos de ação, podem reagir com moléculas circundantes pela doação de elétrons, redução de radicais, recepção de elétrons e oxidação de radicais, através das seguintes reações: a) abstração de hidrogênio; b) reação de adição; c) reação de auto aniquilação e; d) através da dismutação⁴.

Essas reações levam à produção de ROS, RNS e RSS, as quais são relacionadas a doenças, como câncer, doença cardiovascular, incluindo aterosclerose e derrame, doenças neurológicas, doenças renais e hepáticas, hipertensão, artrite reumatoide, síndrome da angústia respiratória do adulto, doenças autoimunes, inflamação, doenças degenerativas relacionadas com o envelhecimento, diabetes mellitus e suas complicações, catarata,

autismo, doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington, vasculites, glomerulonefrites, lúpus eritematoso, úlcera gástrica, hemocromatose e pré-eclâmpsia ^{2, 3, 5, 6}.

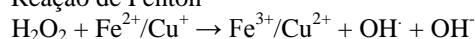
As espécies reativas de oxigênio (ROS) são formadas durante o metabolismo celular e das atividades funcionais, tem importante papel na sinalização celular, apoptose, expressão gênica e transporte iônico. No entanto, quantidades excessivas de ROS podem ter efeitos deletérios em muitas moléculas, incluindo proteínas, lipídios, RNA e DNA, considerando que são excessivamente pequenas e altamente reativas. As ROS podem atacar bases em ácidos nucleicos, cadeias de aminoácidos de proteínas e as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, nos quais o radical OH é um potente oxidante ³.

As células são normalmente capazes de se defender do dano causado pelas espécies reativas de oxigênio, através do uso de enzimas intracelulares, que mantém a homeostase das ROS em níveis baixos. No entanto, durante momentos de estresse e disfunção celular, os níveis de ROS podem aumentar dramaticamente e causar dano celular significativo. Portanto, o estresse oxidativo contribui significativamente para a patogênese das doenças inflamatórias ⁷.

Com o objetivo de prevenir ou reduzir o dano oxidativo causado pelas ROS, o organismo humano e outros seres vivos, desenvolveram um sistema de defesa antioxidante que inclui a atividade enzimática, a quelação de minerais e a ação *scavenger* dos radicais livres, para neutralizar esses radicais depois de serem formados. Além disso, a ingestão de antioxidantes dietéticos pode auxiliar na manutenção de um adequado status antioxidante no organismo ⁸.

O mecanismo de produção de espécies reativas de oxigênio inicia pela dissociação do radical hidroperoxil (HO₂) em condições de pH 7,0, produzindo o ânion superóxido (O₂⁻). Esse ânion é extremamente reativo e pode interagir com um grande número de moléculas gerando ROS diretamente ou através de processos catalisados por enzimas ou metais. O íon superóxido também pode ser detoxificado em peróxido de hidrogênio através da reação de dismutação com a enzima superóxido dismutase (SOD) e finalmente em água através da enzima catalase (CAT). Se o peróxido de hidrogênio reagir com um catalisador como Fe²⁺, ocorrerá a reação de Fenton*, formando o radical hidroxil (OH[·]) ⁹.

* Reação de Fenton



Em relação às espécies reativas de nitrogênio (RNS), o mecanismo de formação do peróxido nitrito (ONOO^-), envolve o óxido nítrico e o ânion superóxido (O_2^-)¹⁰. As espécies reativas de enxofre (RSS) são formadas em condições de oxidação, a partir de tiols para formar o dissulfeto, continuando a reação de oxidação pode resultar em dissulfeto-S-monóxido ou dissulfeto-S-dióxido, como uma molécula intermediária. Por fim, a reação com um tiol reduzido pode resultar na formação de sulfênico ou ácido sulfínico¹¹.

No organismo, os radicais livres são produzidos através de processos inflamatórios, como fagocitose, isquemia e exercício físico. Por outro lado, fatores externos que podem promover a produção de radicais livres são o tabagismo, poluentes ambientais, a radiação, drogas, pesticidas, solventes industriais e ozônio⁵. O balanço entre a produção e a neutralização das ROS por agentes antioxidantes, é muito delicado e se esse balanço tende a superprodução de ROS, as células sofrem as consequências do estresse oxidativo¹².

O principal alvo das espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e das espécies reativas de enxofre são as proteínas, o DNA (ácido desoxirribonucleico), o RNA (ácido ribonucleico), carboidratos e lipídios³.

O dano oxidativo pode ocorrer através de três maneiras em relação às proteínas: a) oxidação de um aminoácido específico; b) formação de um peptídeo mediado por um radical livre; e c) alteração numa cadeia peptídica em decorrência da reação com lipídios oxidados⁵.

Os danos causados por radicais livres no DNA podem ser caracterizados como químicos ou estruturais, com modificações específicas: alteração de todas as bases, oxidação de DNA, modificação na função orgânica, quebra da cadeia cromossômica e alteração na configuração dos cromossomos. Uma reação que causa importante dano no DNA é a produção de radical hidroxil (OH^\cdot), através da reação de Fenton. Esse radical tem a capacidade de reagir com todos os componentes da molécula de DNA, as bases purinas e pirimidinas, assim como a desoxirribose^{13,14}.

Em relação aos carboidratos, a formação de ROS durante a glicação pode contribuir para o dano glico-oxidativo. Durante as fases iniciais da glicosilação não enzimática, a fragmentação dos carboidratos produz espécies reativas de cadeias curtas, como glicolaldeídos, que são moléculas de carboidratos tão pequenas que se tornam propensas à auto oxidação, formando um radical superóxido (O_2^-). O resultado dessa reação pode formar α e β -dicarbonil, os quais tem ação mutagênica¹⁵.

A peroxidação lipídica é iniciada por um ataque aos ácidos graxos com duplas ligações por um radical, com a finalidade de retirar um átomo de hidrogênio de um carbono metilado. Quanto mais duplas ligações presentes no ácido graxo, mais fácil se torna a retirada dos átomos de hidrogênio e conseqüentemente, a formação de radical, tornando os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e ácidos graxos saturados, mais resistentes aos radicais do que os polinsaturados (PUFA). Após a retirada dos átomos de hidrogênio, o carbono central do radical lipídico sofre uma reorganização e reage com oxigênio formando o radical peroxil (LOOH). Essas moléculas altamente reativas retiram átomos de hidrogênio das moléculas próximas e desencadeiam uma reação de peroxidação lipídica. O radical hidroxil (OH \cdot) é um dos principais radicais na lipoperoxidação e é formado nos sistemas biológicos, através da reação de Fenton, como resultado da interação entre peróxido de hidrogênio e íons ¹⁶.

Outra maneira de gerar peróxidos de lipídios é através do ataque aos ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) ou suas ligações insaturadas, pelo oxigênio *singlet*, o qual é uma forma extremamente reativa do oxigênio, no entanto, esse mecanismo não qualifica o início da reação porque o oxigênio *singlet* reage com o ácido graxo, ao invés de retirar o hidrogênio para iniciar a reação. Esse mecanismo é menos importante para a oxidação de lipídios, comparado com a formação do radical peroxil ¹⁶.

Na década de 1990, antioxidantes foram definidos como compostos presentes em pequenas concentrações que reduzem ou inibem a oxidação de outras substâncias ¹⁷. Mais tarde, os mesmos autores definiram antioxidantes como substâncias que retardam, previnem ou removem o dano oxidativo de uma determinada molécula ¹⁸. Por outro lado, Khlebnikov ¹⁹, definiu antioxidantes como qualquer substância que pode “varrer” espécies reativas de oxigênio (ROS), ou indiretamente, agir para regular a defesa antioxidante ou inibir a produção de ROS. Outra propriedade que os compostos devem possuir para serem considerados antioxidantes é a habilidade de formar um novo radical estável na presença de hidrogênio, evitando mais oxidação ²⁰.

Defesas antioxidantes

Durante a evolução dos seres humanos, as defesas endógenas tornaram-se mais efetivas com o objetivo de manter o balanço entre os radicais livres e o estresse oxidativo. A atividade antioxidante pode ser eficaz através de vários caminhos: inibindo as reações de oxidação dos radicais livres (oxidação preventiva) através da inibição da formação de

radicais livres de lipídios; através da propagação da cadeia de auto oxidação (quebra da cadeia de oxidação); como um inibidor da atividade do oxigênio *singlet*; através do sinergismo com outros antioxidantes; como agente redutor da conversão de peroxidação em compostos estáveis; como um agente quelante de metais, que converte metais pró-oxidados (derivados de ferro e cobre) em produtos estáveis; e finalmente, como inibidor das enzimas pró-oxidativas (lipooxigenases) ²¹⁻²⁵.

O sistema antioxidante dos seres vivos é dividido em dois grandes mecanismos: antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos são subdivididos em defesas primárias e secundárias. As defesas primárias são compostas por três importantes enzimas que previnem a formação dos radicais livres ou neutralizam a sua ação, são elas: glutatona peroxidase, a qual doa dois elétrons para reduzir a peroxidase, formando selenóis e eliminando as peroxidases como potencial substrato para a reação de Fenton. A catalase, que converte peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e uma molécula de oxigênio; e a superóxido dismutase converte ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio, como substrato para a catalase ².

A segunda defesa antioxidante inclui a glutatona redutase e glicose-6-fosfato desidrogenase. A glutatona redutase reduz a glutatona da sua forma oxidada para a forma reduzida, portanto, reciclando e continuando a neutralizar mais radicais livres. A glicose-6-fosfato regenera a NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase), criando um ambiente reduzido ^{26,27}. Essas duas enzimas não neutralizam os radicais livres diretamente, mas tem papel importante em outros antioxidantes endógenos.

Considerando os antioxidantes não enzimáticos, podemos citar as vitaminas, cofatores enzimáticos, compostos de nitrogênio e peptídeos. A vitamina A ou retinol apresenta atividade antioxidante através da combinação com o radical peroxil (LOOH), antes de iniciar a peroxidação lipídica ^{28,29}. A Coenzima Q10 que está presente em todas as células e membranas apresenta um importante papel na cadeia respiratória e outras funções no metabolismo celular. A Coenzima Q10 atua prevenindo a formação de radicais lipídicos, como o peroxil (LOOH), embora, já foi reportado que essa coenzima pode neutralizar esses radicais mesmo após a sua formação ³⁰.

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas e após passar pela filtração renal, 90% do ácido úrico é reabsorvido. Previne a superprodução de antioxidantes resultantes da reação da hemoglobina com peróxidos. Por outro lado, também previne a quebra dos eritrócitos pela peroxidação e é um potente *scavenger* do

oxigênio *singlet* e radicais hidroxil ³¹. A glutatona é um tripeptídeo endógeno que protege as células contra os radicais livres pela doação de um átomo de hidrogênio ou um elétron ³².

Apesar da extraordinária eficiência do sistema antioxidante endógeno, não é suficiente e o organismo humano depende de diversos outros tipos de antioxidantes que estão presentes na alimentação para manter os radicais livres em baixas concentrações ³³.

O ácido ascórbico (vitamina C) inclui compostos com atividade antioxidante, como: ácido L-ascórbico e ácido L-dehidroascórbico, os quais são absorvidos pelo trato gastrointestinal. É importante na varredura do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\cdot OH$), oxigênio *singlet* (1O_2) e óxido de nitrogênio reativo ³⁴.

A vitamina E é composta de oito isoformas e quatro tocoferóis. O α -tocoferol é a mais potente e abundante isoforma de tocoferol no sistema biológico. A vitamina E interrompe a peroxidação lipídica, doando o hidrogênio fenólico para o radical peroxil (LOOH), formando o radical tocoferoxil, que apesar de ser um radical, não é reativo e incapaz de continuar a cadeia de oxidação ³⁵. A vitamina K é um grupo de compostos lipossolúveis, essenciais para a conversão do glutamato em γ -carboxiglutamato em várias proteínas-alvo. A estrutura dessas vitaminas confere efeito antioxidante protetor ³⁶.

Ácidos fenólicos são compostos pelos ácidos hidroxinâmico e hidroxibenzóico e estão presentes em tecidos vegetais e algumas vezes nas formas de ésteres e glicosídeos. Apresentam atividade antioxidante como agentes quelantes de metais e *scavengers* de radicais livres com especial impacto nos radicais hidroxil ($\cdot OH$), peroxil (LOOH), ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido nitrito ($ONOO^{\cdot-}$). Um dos compostos mais estudados do grupo hidroxibenzóico é o ácido gálico, que é precursor de vários taninos, enquanto o ácido cinâmico é precursor de todos os ácidos hidrocinâmicos ³⁷.

Carotenoides são o grupo de pigmentos naturais que são sintetizados por plantas e microrganismos, mas não por animais. São divididos em dois grandes grupos: carotenoide hidroxicarbono, conhecidos como caroteno, que contém grupos específicos como licopeno e β -caroteno. E carotenoides oxigenados, conhecidos como xantofilas, como a zeaxantina e luteína. A principal propriedade antioxidante dos carotenoides é neutralizar a ação do oxigênio *singlet*. Os únicos radicais livres que podem oxidar os carotenoides são os radicais peroxil (LOOH). Os carotenoides apresentam baixa reatividade, mas também

podem decompor-se e formar compostos não radicais, determinando o ataque aos radicais livres e unindo-se a esses radicais ³⁸.

Mínerais são encontrados em pequenas quantidades nos tecidos animais e constituem uma pequena proporção dos antioxidantes dietéticos, porém, tem um importante papel no seu metabolismo. Em relação à atividade antioxidante, os minerais mais ativos são o selênio e o zinco. O selênio pode ser encontrado na forma orgânica e inorgânica nos tecidos humanos. Não age diretamente nos radicais livres, mas é uma parte indispensável em muitas enzimas antioxidantes (metaloenzimas, glutadiona peroxidase, tioredoxina redutase), as quais não teriam nenhuma ação sem esse mineral ³⁹.

O zinco é um mineral fundamental em várias rotas metabólicas, assim como o selênio, não age diretamente sobre os radicais livres, mas é muito importante na prevenção da sua formação. O zinco também é um inibidor da NADPH oxidase, que catalisa a produção do radical oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$) desde o oxigênio, usando o NADPH como um doador de elétrons. Faz parte da enzima superóxido dismutase, que converte o radical oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Finalmente o zinco compete com o cobre para unir-se à parede celular, portanto, reduzindo a produção de radicais hidroxil ($\cdot\text{OH}$) ⁴⁰.

Os flavonoides são antioxidantes naturais encontrados nos alimentos, suas ações são conferidas pelo grupo fenólico hidroxil unido à estrutura do anel fenólico e podem agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio, extinção do oxigênio *singlet*, varredor de radical superóxido e até mesmo como agente quelante de metais. Os flavonoides também ativam enzimas antioxidantes, reduzem os radicais α -tocoferol, inibem as oxidases, atenuam o estresse de nitrosaminas e aumentam os níveis de ácido úrico e moléculas de baixo peso molecular ^{41,42}.

COMPOSTOS BIOATIVOS

Compostos bioativos são nutrientes não clássicos, presentes em todos os vegetais e são consideradas substâncias não nutricionais, mas, ingredientes vitais para a manutenção da saúde humana. Nos últimos anos, diversos compostos bioativos foram identificados pelo seu potencial antioxidante, anticancerígeno e anti-inflamatório ⁴³. Dentre outros compostos bioativos, os flavonoides geraram interesse pelas suas características antioxidantes e como *scavengers* de radicais livres, observados “in vitro” ⁴⁴. Foram descritos inicialmente como pigmentos de vegetais, porém, em 1936, Rusnyak e Szent-

Gyorgyi, pesquisadores russos, identificaram que pequenas porções de pimenta vermelha e suco de limão aumentavam a resistência dos capilares. Esses pesquisadores descreveram que os flavonoides apresentavam propriedades vitamínicas e denominaram de vitamina P, nome que foi posteriormente descartado. Essas descobertas estimularam novos interesses na identificação de mais flavonoides nos alimentos ⁴³.

Os compostos polifenólicos são um dos mais numerosos grupos de substâncias do reino vegetal. São produzidos como resultado do metabolismo secundário das plantas e são frequentemente encontrados unidos à glicosídios, sendo, portanto, hidrossolúveis. Eventualmente os polifenóis podem ser encontrados nas plantas como agliconas. São formados a partir de duas rotas metabólicas: shikimate e acetato ⁴⁵.

Na natureza, mais de 8000 estruturas polifenólicas são encontradas e a característica comum dos compostos é a presença do anel aromático ligado a um componente hidroxila (Fig. 1) ⁴⁶. Por sua vez, os polifenóis podem ser divididos em 10 diferentes classes, baseados na sua estrutura química ⁴⁵. Dentre essas classes, os flavonoides são a maior classe dos polifenóis com uma estrutura comum de difenilpropano ($C_{6}O_3C_6$), consistindo em dois anéis aromáticos unidos por três carbonos. O anel A provém da molécula de resorcinol ou floroglucinol sintetizado pela rota do acetato e apresenta um padrão característico de hidroxilação na posição cinco e sete. O anel B provém da rota shikimate e é normalmente 4'-, 3'4', ou 3'4'5'- hidroxilado ⁴⁶.

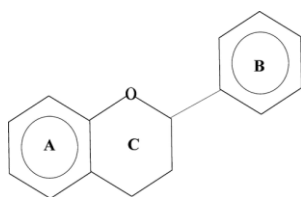


Fig 1. Estrutura básica de um flavonoide ⁴⁴.

Por sua vez, os flavonoides podem ser subdivididos em seis grandes subclasses, baseado na variação do anel heterocíclico C, incluindo: as flavonas, flavonóis, flavanonas, catequinas, antocianidinas e isoflavonas (Tab. 1). Podem ser encontrados em alimentos e

bebidas de origem vegetal, como frutas, vegetais, chás, cacau e vinho. No subgrupo de flavonóis e flavonas, o flavonol quercitina é o mais encontrado em alimentos, assim como kaempferol, miricetina e as flavonas apigenina e luteolina. Os chás produzidos a partir da *Camellia sinensis*, e a cebola, são as principais fontes alimentares de flavonóis e flavonas⁴⁷.

Tabela 1. Classificação dos flavonoides e fontes alimentares

Flavonoide	Sub-classe	Alimentos
Flavonona	apigenin, luteolina, diosmetin	Salsinha, aipo, pimentão vermelho, tomilho
Flavonol	quercitina, miricetina, kaempferol	Cebola, brócolis, maçã, cereja, chás, couve, radite
Flavanonas	narigenina, nesperidina	Frutas cítricas, ameixa vermelha
Catequinas	epicatequina, galactocatequina	Chás (<i>Camellia sinensis</i>), maçã, cacau
Antocianidina	pelargonidina, malvidina, cianidina	Cerejas, uvas
Isoflavonas	genisteína, daidzeína	Soja, leguminosas

A formação dos flavonoides nas plantas é influenciada por vários fatores, como: a luminosidade, as características genéticas da planta, condições ambientais, germinação, grau de maturação, processamento e armazenamento, assim como, a variação das espécies⁴⁵. No entanto, existem discrepâncias entre as recomendações de ingestão de flavonoides, devido a dificuldades em estabelecer um método de análise dos diferentes tipos de polifenóis⁴⁷.

As informações na literatura sobre a quantidade de polifenóis nos alimentos é incompleta e frequentemente contraditória, portanto, a estimativa da ingestão dietética dos flavonoides é difícil, o que pode confundir nas inferências de relações epidemiológicas, considerando a saúde e as doenças⁴⁷. Em 1993, Hertog *et al.*,⁴⁸ estabeleceram a ingestão de flavonóis e flavonas em 23 mg/dia. Mais tarde, Leth e Justesen em 1998, estimaram a ingestão de flavonóis, flavonas e flavononas em 28 mg/dia⁴⁹.

Polifenóis e o Paradoxo Francês

A característica dietética do Paradoxo Francês foi observada nas populações francesas e italianas e verificada posteriormente em outras populações Mediterrâneas. Estudos epidemiológicos revelaram que a dieta rica em flavonoides está relacionada com o aumento da longevidade e a redução da incidência de doenças cardiovasculares, observada nessas populações apesar do alto consumo de gorduras saturadas⁵⁰. Uma explicação para o

Paradoxo Francês parece estar relacionada com os componentes da dieta mediterrânea, que é rica em frutas e vegetais, fontes de vitaminas e fibras ⁵¹. Além dos alimentos de origem vegetal, essas populações tem um consumo diário de vinho tinto, que é rico em polifenóis. A composição dos polifenóis de cada flavonoide é responsável pelas suas propriedades antioxidantes, o que caracteriza a proteção contra as doenças cardiovasculares nessas populações ^{52, 53}.

Outra explicação para o Paradoxo Francês é o metabolismo dos lipídios, no qual, os polifenóis, e em especial as catequinas, são efetivos na reação de quebra da cadeia antioxidante e são varredores de radicais livres inibindo a peroxidação lipídica e a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Esses lipídios são ricos em ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) e são os maiores transportadores de lipoproteínas de baixa densidade ligadas ao colesterol ⁴². O primeiro passo no processo de oxidação do LDL envolve a oxidação dos ácidos graxos PUFAs, que são degradados em aldeídos. Os monócitos retroalimentam o processo à medida que se tornam macrófagos e contribuem para as espécies reativas de oxigênio nos vasos, onde tentam remover os depósitos de lipídios, através da ativação do sistema imunológico, que envolve a ativação de diversas enzimas e desencadeia a oxidação. Como os depósitos oxidados são absorvidos pelos macrófagos, estes são transformados em células espumosas, as quais, juntamente com o LDL oxidado e apolipoproteínas formam os componentes das estrias lipídicas nos vasos. Esse processo de estresse oxidativo através da agregação plaquetária e oxidação do LDL pode ser inibido pelo resveratrol do vinho tinto ⁵⁴.

O interesse pelos efeitos dos compostos bioativos foi despertado por dois estudos longitudinais, que avaliaram a ingestão de alimentos de origem vegetal, frutas e verduras e a incidência de doenças cardiovasculares. O primeiro estudo realizado por Hertog e cols. ⁴⁸, o *Zutphen Elderly Study* observou uma correlação inversa entre a ingestão dos flavonoides e a incidência de doenças cardiovasculares. Esse estudo, com 10 anos de seguimento, avaliou um grupo de 805 homens, entre 65 e 84 anos que apresentaram redução significativa no risco relativo de mortalidade, por doenças cardiovasculares, no mais alto quartil de ingestão diária de flavonóis e flavonas (30 mg/dia). Esse nível de ingestão também apresentou uma redução de 38% na incidência do primeiro infarto.

Outro estudo que reforçou o interesse pelos flavonoides foi *The Rotterdam Study* ⁵⁵. Após 5,6 anos de seguimento, Geleijnse e cols. verificaram uma redução de 65% no risco relativo para infarto não fatal numa coorte de 4807 indivíduos de 55 anos, porém, apenas

7% de redução no risco de infarto fatal. Esses estudos demonstraram um efeito positivo no consumo de flavonoides e um reforço na hipótese de que o alto consumo de frutas e vegetais é benéfico para a saúde ⁵⁶.

Atividade antioxidante dos flavonoides

Uma dieta com grande quantidade de frutas e vegetais apresenta características protetoras contra várias patologias, como as doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer ^{57, 58}. Antioxidantes naturais e fibras dietéticas são considerados os principais nutrientes responsáveis por esses efeitos protetores. As espécies reativas de oxigênio são formadas “in vivo” durante o metabolismo aeróbico e podem causar dano ao DNA, proteínas e lipídios, apesar dos mecanismos antioxidantes biológicos ⁵⁹.

Os flavonoides, associados com outros antioxidantes como as vitaminas C e E estão relacionados com a inibição da peroxidação lipídica, causada pelos ROS. Ao contrário das vitaminas C e E, que estão concentradas na fase aquosa e na bicamada fosfolipídica, respectivamente, os flavonoides estão localizados entre as duas fases, devido a sua propriedade hidrofílica. Portanto, os flavonoides podem bloquear os mecanismos de iniciação de radicais na interface das membranas, prevenindo a progressão da formação dos radicais em cadeia, prevenindo a lipoperoxidação ⁴⁷.

No entanto, as tentativas de controlar o estresse oxidativo através da suplementação de vitaminas antioxidantes, C e E, têm apresentado resultados controversos. Estudos observacionais avaliando o uso de complexos multivitamínicos e a incidência de doença cardiovascular têm sido limitados e inconsistentes ⁶⁰⁻⁶³. Grandes ensaios clínicos randomizados falham ao tentar demonstrar um benefício do consumo de vitaminas antioxidantes na prevenção de doenças cardiovasculares. Por outro lado, estudos clínicos com desfechos substitutos, tais como melhora da função endotelial e redução de escores de aterosclerose, podem apresentar resultados favoráveis relacionados à ingestão de vitaminas antioxidantes ⁶⁴.

Estudos recentes sugerem que os flavonoides dietéticos protegem o DNA do dano induzido por radicais livres através do mecanismo *scavenger*. Podem reduzir a incidência de quebra da cadeia dupla, assim como o dano de base residual através do rápido reparo químico ⁶⁵. Além dessas propriedades, os flavonoides podem atuar como agentes quelantes de íons metálicos, responsáveis pela geração de ROS e conseqüentemente, inibir o início da reação de lipoxigenação ⁶⁶.

Muitos flavonoides podem reduzir o estresse oxidativo, induzindo a formação da glutationa S-transferase (GST). As GSTs agem na detoxificação de potentes agentes alquilantes, incluindo compostos como herbicidas, pesticidas e xenobióticos. Elas catalisam a reação destes compostos com o grupamento SH da glutationa, neutralizando assim, seus sítios eletrofílicos e transformando-os em produtos mais hidrossolúveis, que são de fácil excreção ⁶⁷.

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é determinada pela sua estrutura, em particular, pela facilidade na qual o átomo de hidrogênio, de um grupo aromático hidroxil, pode ser doado a um radical livre e a habilidade de um composto aromático suportar um elétron desemparelhado como resultado do deslocamento ao redor do sistema M-elétron ⁶⁸.

Apesar dos flavonoides apresentarem uma grande capacidade antioxidante “in vitro”, a sua eficiência “in vivo” é limitada por alguns fatores. A absorção dos flavonoides é baixa em comparação com outros antioxidantes dietéticos, como as vitaminas C e E ⁶⁹. Somente as agliconas podem atravessar a parede celular do intestino. Muitos flavonoides são encontrados como β -glicosídeos e apresentam redução na absorção a não ser que a ligação com β -glicosídeos seja rompida. Essa ligação pode ser desfeita através da hidrólise proveniente dos microrganismos intestinais, por isso, a biodisponibilidade de muitos flavonoides dietéticos é limitada ⁷⁰. A meia-vida dos flavonoides no sangue é pequena e se extingue em poucas horas, limitando a capacidade dos flavonoides dietéticos agirem como antioxidantes no plasma, principalmente quando comparado com outros antioxidantes presentes no plasma em altas concentrações prontos para serem mobilizados ⁷¹.

Devemos destacar que nem todos os compostos bioativos e vitaminas apresentam os mesmos mecanismos de ação. Por exemplo, antioxidantes polifenólicos e vitaminas podem afetar vários alvos moleculares diretamente, através do mecanismo de ativação de radicais livres, como sinalizadores intracelulares. Além disso, podem atuar no caminho de transdução de sinal e apresentar muitos efeitos adversos, como a alteração do equilíbrio pró-oxidante/oxidante ⁷². Alguns compostos polifenólicos agem não somente como varredores de ROS, mas também como agentes quelantes de metais (Fe^{2+} , Cu^+), o que contribui para atenuar o estresse oxidativo ⁷³.

Por outro lado, o organismo apresenta diversas defesas endógenas ao estresse oxidativo. O plasma humano contém muitas proteínas com propriedades antioxidantes

intrínsecas, como proteínas sulfúricas, como a glutathiona peroxidase ou proteínas de transição, como superóxido dismutase ^{74, 75}.

Apesar do organismo humano apresentar um complexo sistema de defesa antioxidante endógeno, que varre radicais livres, as células podem apresentar desordens fisiológicas, morrer ou ocorrer apoptose, devido ao dano irreparável causado por radicais livres ao DNA e alteração nas membranas celulares. Muitas proteínas endógenas e nutrientes podem ser cito-protetores, porém, o dano causado por um radical livre é inevitável. Esses processos oxidativos ocorrem com o avançar da idade, não apenas através de processos patológicos, mas também em indivíduos saudáveis. Deficiências em vitaminas antioxidantes, escassez de defesa antioxidante adequada e estressores ambientais, como radiação ionizante, podem levar a estados de doença ⁷⁵.

As informações sobre os flavonoides e sua ação antioxidante “in vivo” são escassas, mas é certo que os flavonoides têm uma contribuição significativa nas defesas antioxidantes do organismo. Enquanto mais estudos são necessários para estabelecer os benefícios dos flavonoides e suas ações no organismo, é possível que a ingestão das frutas e vegetais na sua integridade, seja mais importante para obter o benefício, do que a ingestão de apenas um constituinte vegetal.

REFERÊNCIAS

1. Labarthe DR, Dunbar SB. Global cardiovascular health promotion and disease prevention: 2011 and beyond. *Circulation* 2012;125(21):2667-76.
2. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging* 2007;2(2):219-36.
3. Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med* 2010;14(4):840-60.
4. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochemical Journal* 1984;222(1):1-15.
5. Chandra N, Lobo V, Patil A, Phatak A. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 2010;4:118.
6. Singh PP, Chandra A, Mahdi F, Roy A, Sharma P. Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in human health and disease. *Indian J Clin Biochem* 2010;25(3):225-43.
7. Liu RH, Hotchkiss JH. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat Res* 1995;339(2):73-89.
8. Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 2012;51C:15-25.
9. Flora S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009;2(4):191-206.
10. Hu FB. Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *Am J Clin Nutr* 2003;78(3 Suppl):544S-51S.
11. Giles GI, Tasker KM, Jacob C. Hypothesis: The role of reactive sulfur species in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 2001;31(10):1279-83.
12. Wiernsperger NF. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: Revisiting the controversy. *Diabetes and Metabolism* 2003;29(6):579-85.
13. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine* 2002;32(11):1102-15.
14. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004;266(1-2):37-56.

15. Benov L, Beema AF. Superoxide-dependence of the short chain sugars-induced mutagenesis. *Free Radical Biology and Medicine* 2003;34(4):429-33.
16. Halliwell B, Chirico S. *Am J Clin Nutr* 1993;715.
17. Halliwell B, Gutteridge JMC. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine* 1995;18(1):125-6.
18. Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008;476(2):107-12.
19. Khlebnikov AI, Schepetkin IA, Domina NG, Kirpotina LN, Quinn MT. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2007;15(4):1749-70.
20. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free radical research communications* 1990;9(1):1-32.
21. Darmanyan AP, Gregory DD, Guo Y, Jenks WS, Burel L, Eloy D, et al. Quenching of singlet oxygen by oxygen- and sulfur-centered radicals: Evidence for energy transfer to peroxy radicals in solution. *Journal of the American Chemical Society* 1998;120(2):396-403.
22. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002;13(10):572-84.
23. Kancheva VD. Phenolic antioxidants - Radical-scavenging and chain-breaking activity: A comparative study. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2009;111(11):1072-89.
24. Pokorný J. Are natural antioxidants better - and safer - Than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology* 2007;109(6):629-42.
25. Min DB, Boff JM. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2002;1(2):58-72.
26. Gamble PE, Burke JJ. Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system: I. Alterations in glutathione reductase activity. *Plant Physiol* 1984;76(3):615-21.
27. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc* 2006;1(6):3159-65.

28. Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology and Medicine* 1999;26(5-6):746-61.
29. Jee JP, Lim SJ, Park JS, Kim CK. Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2006;63(2):134-9.
30. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 2004;1660(1):171-99.
31. Kand'ár R, Žáková P, Mužáková V. Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography. *Clinica Chimica Acta* 2006;365(1-2):249-56.
32. Steenvoorden DPT, Beijersbergen Van Henegouwen GMJ. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1997;41(1-2):1-10.
33. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 2000;63(7):1035-42.
34. Barros AIRNA, Nunes FM, Gonçalves B, Bennett RN, Silva AP. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry* 2011;128(1):165-72.
35. Burton GW, Traber MG. Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annual Review of Nutrition* 1990;10:357-82.
36. Vervoort LMT, Ronden JE, Thijssen HHW. The potent antioxidant activity of the vitamin K cycle in microsomal lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology* 1997;54(8):871-6.
37. Krimmel B, Swoboda F, Solar S, Reznicek G. OH-radical induced degradation of hydroxybenzoic- and hydroxycinnamic acids and formation of aromatic products-A gamma radiolysis study. *Radiation Physics and Chemistry* 2010;79(12):1247-54.
38. Paiva SAR, Russell RM, Dutta SK. β -carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition* 1999;18(5):426-33.
39. Tabassum A, Bristow RG, Venkateswaran V. Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: A good thing? *Cancer Treatment Reviews* 2010;36(3):230-4.
40. Prasad AS, Bao B, Beck FWJ, Kucuk O, Sarkar FH. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radical Biology and Medicine* 2004;37(8):1182-90.
41. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 1996;20(7):933-56.

42. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 2011;82(4):513-23.
43. Patil BS, Jayaprakasha GK, Chidambara Murthy KN, Vikram A. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. *J Agric Food Chem* 2009;57(18):8142-60.
44. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002;22:19-34.
45. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;56(11):317-33.
46. Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Towards Prolongation of the Healthy Life Span: Practical Approaches to Intervention* 1998;854:435-42.
47. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart-disease - The Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993;342(8878):1007-11.
48. Justesen U, Knuthsen P, Leth T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 1998;799(1-2):101-10.
50. Burr ML. Explaining the French paradox. *J R Soc Health* 1995;115(4):217-9.
51. de Lorgeril M, Salen P, Paillard F, Laporte F, Boucher F, de Leiris J. Mediterranean diet and the French paradox: two distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific theory on the role of nutrition in coronary heart disease. *Cardiovasc Res* 2002;54(3):503-15.
52. Lee CY, Cheng HM, Sim SM. Bioavailability of dietary flavonoids and carotenoids. *Current Topics in Nutraceutical Research* 2006;4(1):33-51.
53. Martínez-González MA, Fernández-Jarne E, Serrano-Martínez M, Martí A, Martínez JA, Martín-Moreno JM. Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score. *Eur J Nutr* 2002;41(4):153-60.
54. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993;341(8843):454-7.
55. Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 2002;75(5):880-6.

56. Sies H. Polyphenols and health: update and perspectives. *Arch Biochem Biophys* 2010;501(1):2-5.
57. Knekt P, Ritz J, Pereira MA, O'Reilly EJ, Augustsson K, Fraser GE, et al. Antioxidant vitamins and coronary heart disease risk: a pooled analysis of 9 cohorts. *Am J Clin Nutr* 2004;80(6):1508-20.
58. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 1995;33(12):1061-80.
59. Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine* 2009;46(5):531-42.
60. Watkins ML, Erickson JD, Thun MJ, Mulinare J, Heath CW. Multivitamin use and mortality in a large prospective study. *Am J Epidemiol* 2000;152(2):149-62.
61. Muntwyler J, Hennekens CH, Manson JE, Buring JE, Gaziano JM. Vitamin supplement use in a low-risk population of US male physicians and subsequent cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2002;162(13):1472-6.
62. Osganian SK, Stampfer MJ, Rimm E, Spiegelman D, Hu FB, Manson JE, et al. Vitamin C and risk of coronary heart disease in women. *J Am Coll Cardiol* 2003;42(2):246-52.
63. Holmquist C, Larsson S, Wolk A, de Faire U. Multivitamin supplements are inversely associated with risk of myocardial infarction in men and women--Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP). *J Nutr* 2003;133(8):2650-4.
64. Fang JC, Kinlay S, Beltrame J, Hikiti H, Wainstein M, Behrendt D, et al. Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial. *Lancet* 2002;359(9312):1108-13.
65. Anderson RF, Amarasinghe C, Fisher LJ, Mak WB, Packer JE. Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids. *Free Radical Research* 2000;33(1):91-103.
66. Rietveld A, Wiseman S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J Nutr* 2003;133(10):3285S-92S.
67. Fiander H, Schneider H. Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics. *Cancer Letters* 2000;156(2):117-24.
68. Lien EJ, Ren SJ, Bui HYH, Wang RB. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 1999;26(3-4):285-94.

69. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79(5):727-47.
70. Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin naringenin. Dietary sources, bioactivities, and epidemiology. *Nutrition Research* 2004;24(10):851-74.
71. Stocker R, Bowry VW, Frei B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(5):1646-50.
72. Romier C, Cocchiarella F, Mantovani R, Moras D. The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *J Biol Chem* 2003;278(2):1336-45.
73. Kumamoto M, Sonda T, Nagayama K, Tabata M. Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65(1):126-32.
74. Rauca C, Wiswedel I, Zerbe R, Keilhoff G, Krug M. The role of superoxide dismutase and alpha-tocopherol in the development of seizures and kindling induced by pentylentetrazol - influence of the radical scavenger alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron. *Brain Res* 2004;1009(1-2):203-12.
75. Nomura K, Imai H, Koumura T, Arai M, Nakagawa Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J Biol Chem* 1999;274(41):29294-302.

HIPÓTESE CONCEITUAL

Esse estudo parte do pressuposto de que a ingestão de alimentos ricos em substâncias antioxidantes auxiliam na redução do estresse oxidativo, na resposta inflamatória e no perfil lipídico de pacientes com doença cardiovascular submetidos a implante de stent coronariano.

OBJETIVOS

Objetivo Principal

Avaliar o impacto de uma dieta rica em substâncias antioxidantes na redução do estresse oxidativo, na resposta inflamatória e no perfil lipídico de pacientes com doença cardiovascular submetidos a implante de stent coronariano.

Objetivos Secundários

- 1) Avaliar a associação entre o estresse oxidativo e o perfil inflamatório, após a administração de uma dieta rica em substâncias antioxidantes;
- 2) Avaliar os níveis dos marcadores inflamatórios como a proteína C-reativa e marcadores de estresse oxidativo (sulfidril e FRAP) após a administração de uma dieta rica em antioxidantes;
- 3) Avaliar os níveis plasmáticos de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicerídios ao longo do seguimento;
- 4) Avaliar as características antropométricas dos pacientes (peso, altura e circunferência abdominal) ao longo do seguimento.

ARTIGO EM PORTUGUÊS

**Efeitos de uma dieta rica em flavonoides sobre o estresse oxidativo,
inflamação e perfil lipídico em pacientes submetidos à angioplastia
coronária com implante de stent: ensaio clínico randomizado**

Cammerer, Magda Ambros (1), Gonçalves, Sandro Cadaval (2), Andrades, Michael
Everton (2,3), Lopes, Amanda (3), Wainstein, Marco Vugman (1,2,4)

1. Programa de Pós-graduação em Ciências Cardiovasculares: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
2. Hospital de Clínicas de Porto Alegre
3. Centro de Pesquisa Experimental
4. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Titulo abreviado: Estresse oxidativo e doença cardiovascular

Palavras-chave: flavonoides, estresse oxidativo, LDL-colesterol, doença cardiovascular, dieta, alimentos antioxidantes

Endereço para correspondência:

Magda Ambros Cammerer

Rua Eça de Queirós, 349/701

90670-020 – Porto Alegre – RS

Fone: 51-98063749

E-mail: magda.ambros@hotmail.com

Efeitos de uma dieta rica em flavonoides sobre o estresse oxidativo, inflamação e perfil lipídico em pacientes submetidos à angioplastia coronária com implante de stent: ensaio clínico randomizado.

RESUMO

Introdução: A ingestão de alimentos antioxidantes pode reduzir o estresse oxidativo e contribuir de forma direta no processo aterosclerótico através da redução do LDL oxidado.

Objetivos: avaliar o papel da dieta rica em flavonoides no estresse oxidativo, na resposta inflamatória e no perfil lipídico de pacientes com doença cardiovascular submetidos a implante de stent coronariano.

Métodos: trinta e três pacientes submetidos à angioplastia coronária com implante de stent foram randomizados no grupo dieta controle, com base nas recomendações do NCEP III e dieta antioxidante (AOX), rica em alimentos fontes de flavonoides, por 6 meses. As informações referentes à ingestão alimentar foram coletadas no início e término do seguimento, assim como, os níveis de estresse oxidativo (FRAP e sulfidril) e marcadores inflamatórios (Proteína C-reativa).

Resultados: A orientação nutricional resultou numa redução da ingestão energética, de carboidratos e de lipídios no grupo dieta AOX, e um aumento na ingestão de flavonoides. Os marcadores de estresse oxidativo, FRAP e sulfidril e a proteína C-reativa não foram alterados no grupo dieta AOX, porém, os níveis de LDL-colesterol apresentaram redução significativa quando comparados com o grupo controle.

Conclusão: os resultados sugerem que uma dieta rica em alimentos antioxidantes à base de flavonoides, não está associada com a redução do estresse oxidativo e do perfil inflamatório em pacientes submetidos à angioplastia coronariana com implante de *stent*, a despeito de uma melhora no perfil lipídico destes pacientes.

Palavras-chave: flavonoides, estresse oxidativo, LDL-colesterol, doença cardiovascular, dieta, alimentos antioxidantes

INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é um processo fisiológico que ocorre durante o metabolismo das células e tem um papel importante na sinalização celular, apoptose, expressão gênica e transporte iônico¹. No entanto, quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio (ROS), podem ter efeito deletério em várias moléculas, incluindo proteínas, lipídios, RNA (ácido ribonucleico) e DNA (ácido desoxirribonucleico)². As células são normalmente capazes de se defender contra o ataque das ROS, porém, em momentos de estresse, estas espécies aumentam a sua quantidade e podem causar dano celular³.

O estresse oxidativo pode contribuir de forma direta no processo aterosclerótico através do LDL oxidado (*low density lipoprotein*)⁴. Este é um constituinte da placa aterosclerótica, que participa da progressão da lesão do vaso, através do aumento das interações entre monócitos e células endoteliais, com consequente estímulo à proliferação de células musculares lisas e da síntese de fatores de crescimento⁵. A angioplastia coronária representa um modelo clássico de aterosclerose acelerada⁶ cuja consequência clínica pode ser a reestenose. Os stents coronarianos comprovadamente reduzem a reestenose pós-angioplastia através da inibição do remodelamento negativo do vaso⁷. Entretanto, os stents coronarianos induzem uma resposta inflamatória associada à disfunção do endotélio⁸.

As tentativas de controlar o estresse oxidativo através de suplementação exógena de vitaminas antioxidantes têm obtido resultados controversos. Estudos observacionais do uso de complexos multivitamínicos e incidência de doença cardiovascular têm sido limitados e inconsistentes⁹⁻¹². Estudos clínicos com desfechos substitutos, tais como melhora da função endotelial e redução de escores de aterosclerose, também podem apresentar resultados favoráveis relacionados à ingestão de vitaminas antioxidantes¹³. Entretanto, grandes ensaios clínicos randomizados falham ao tentar demonstrar um benefício do consumo de vitaminas antioxidantes na prevenção de doenças cardiovasculares¹⁴⁻¹⁷.

As chamadas dietas antioxidantes à base de alimentos ricos em substâncias flavonoides tais como as dietas do Mediterrâneo e o consumo de vinho tinto em doses moderadas, podem estar associadas com um potencial benefício cardiovascular¹⁸. No entanto, não existem estudos randomizados que tenham demonstrado que tais intervenções dietéticas possam efetivamente reduzir o estresse oxidativo. O objetivo do presente estudo foi, portanto, avaliar através de um ensaio clínico randomizado, o papel da dieta rica em

flavonoides no estresse oxidativo e no perfil inflamatório de pacientes com doença cardiovascular, submetidos a implante de stent coronariano.

MÉTODOS

Desenho do estudo e população

Ensaio clínico randomizado realizado com pacientes submetidos à angioplastia coronária com implante de stent, na Unidade de Hemodinâmica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do mesmo hospital (protocolo 06-327).

Foram incluídos no estudo pacientes de ambos os sexos, com idade entre 18 e 75 anos, com indicação de angioplastia eletiva com implante de *stent* coronariano não farmacológico. Foram excluídos, gestantes, portadores de infarto agudo do miocárdio, síndrome coronariana aguda, insuficiência renal crônica, insuficiência cardíaca congestiva classe funcional III ou IV, neoplasias, doenças inflamatórias do colágeno e diabetes mellitus.

Protocolo do estudo

Os pacientes foram submetidos à angioplastia com implante de *stent* conforme as rotinas da Unidade de Hemodinâmica e as indicações do médico assistente. Todos os pacientes receberam ticlopidina ou clopidogrel e AAS pré-procedimento e heparina na dose 100 de Ui/kg durante o procedimento. Os pacientes que utilizavam antagonistas dos receptores IIbIIIa, como terapia adjuvante, receberam 70% da dose de heparina, com o objetivo de atingir um tempo de coagulação ativada entre 200 e 250 segundos. Após o procedimento, todos os pacientes receberam tratamento com sinvastatina 40 mg/dia, ticlopidina 250 mg 12/12 h ou clopidogrel 75 mg/dia, além de AAS 100 mg/dia. Após a realização do procedimento, os pacientes eram informados da intenção do estudo e convidados a participar. Aqueles que aceitavam, assinavam o termo de consentimento livre e esclarecido e recebiam informações sobre a continuidade do estudo através de consultas ambulatoriais.

Uma amostra de sangue de 10 ml foi coletada para a dosagem do perfil lipídico e proteína C-reativa e encaminhada para o Serviço de Análises Clínicas do HCPA. Para as análises dos marcadores de estresse oxidativo, (sulfidril e FRAP), as amostras coletadas foram colocadas em um tubo com heparina e imediatamente imersas num depósito com

gelo, sendo centrifugadas dentro de 60 minutos, a 3000 rpm, durante 10 minutos à temperatura de 4°C. O plasma então obtido foi armazenado a uma temperatura de 80°C negativos para posterior análise.

Randomização

Após 14 dias da intervenção coronariana percutânea, cada paciente foi agendado para a primeira consulta ambulatorial. Nessa consulta, foi realizada a avaliação antropométrica, a randomização dos pacientes e aplicado o recordatório alimentar de 24h. Depois desses procedimentos, os pacientes foram randomizados para um dos seguintes grupos: grupo intervenção e grupo controle, com base numa tabela de números randomizados, gerados por um programa de computador.

O grupo intervenção recebeu orientação dietética adequada para as suas necessidades nutricionais, com alimentos fontes de flavonoides (dieta AOX). O grupo controle recebeu orientações nutricionais para manter o seu estado nutricional. Os pacientes dos dois grupos receberam utensílios para medir a quantidade de alimentos ingeridos nas suas residências, incluindo uma colher de servir, um copo plástico com capacidade de 250 ml e um prato médio.

Três meses após o início do acompanhamento e, novamente, seis meses após, cada paciente foi avaliado através do perfil lipídico, recordatório alimentar de 24h, diário alimentar de três dias e antropometria. Uma amostra de sangue de 10 ml foi coletada em cada uma dessas consultas para as análises do estresse oxidativo, resposta inflamatória e perfil lipídico.

Avaliação Antropométrica

A avaliação antropométrica foi realizada em cada consulta, através da mensuração do peso, estatura e circunferência do abdome. O peso e a altura foram aferidos em uma balança antropométrica e o Índice de Massa Corpórea (IMC) foi calculado através da fórmula do Índice de Quetelet, (altura elevada ao quadrado dividido pelo peso atual)¹⁹. A circunferência abdominal foi medida no ponto médio entre a margem da costela inferior e a crista ilíaca²⁰.

Acompanhamento Nutricional

Os pacientes foram randomizados para um dos seguintes tratamentos: grupo intervenção, que recebeu dieta de acordo com as necessidades energéticas, com base nas recomendações do NCEP ATP III²¹, rica em alimentos contendo substâncias antioxidantes, (dieta AOX), tais como vegetais crucíferos, cebola, tomate cereja, uva, entre outros, perfazendo uma recomendação diária de ingestão de 40 mg/dia^{22, 23}, durante seis meses. O grupo controle recebeu orientação nutricional convencional, através de folheto informativo, com base nas recomendações do NCEP ATP III, de acordo com as suas necessidades energéticas e também foi acompanhado por seis meses.

As dietas foram calculadas para cada paciente de acordo com as suas necessidades nutricionais, nível socioeconômico e hábitos alimentares. As dietas foram compostas por 60% de carboidratos, limitando em 10% de carboidratos simples; 15% de proteínas; e até 25% de lipídios, evitando o excesso de gorduras saturadas. Foi estabelecido um limite máximo de ingestão de 200 mg/dia de colesterol alimentar. As fibras dietéticas foram recomendadas em 20 a 30 g/dia e o consumo de água nos intervalos das refeições foi estimulado. Os pacientes foram orientados a realizar cinco a seis refeições diárias, de preferência em casa, sendo três refeições principais e dois ou três lanches leves nos intervalos. A dieta incluiu uma listagem de alimentos fontes de flavonoides que deveriam ser ingeridos quatro vezes ao dia, distribuídos nas refeições e lanches (Tab. 1). O modo de preparo desses alimentos também foi orientado, os vegetais verdes, de preferência consumidos crus, ou quando necessário, cozidos e as frutas em preparações cruas.

As informações sobre a ingestão alimentar foram obtidas através do recordatório alimentar de 24h. Além desse método, os pacientes foram orientados a preencher um diário alimentar de três dias, sendo dois dias úteis e um dia de final de semana. Os utensílios entregues no início do estudo serviram para indicar a quantidade dos alimentos consumidos. As medidas caseiras foram transformadas em gramas e miligramas, com o objetivo de possibilitar o cálculo da ingestão alimentar, calculado através do Programa de Apoio à Nutrição da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP), versão 1.6. Para o cálculo dos flavonoides ingeridos foi utilizado o *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods*²⁴.

Perfil Lipídico

O perfil lipídico foi verificado através das medidas de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicerídeos, o sangue foi coletado após 12h de jejum. O colesterol total e triglicerídeos foram medidos através do método enzimático colorimétrico (Laboratório Merck® - Ádvia 1800) e o HDL-colesterol foi mensurado através do método enzimático colorimétrico homogêneo (Laboratório Merck® - Ádvia 1800). O LDL-colesterol foi calculado pela Equação de Friedewald ²⁵ e a proteína C-reativa ultra sensível foi mensurada pelo método de turbidometria (Laboratório Merck® - Ádvia 1800).

Estresse Oxidativo

Após a coleta das amostras de sangue, estas foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos à temperatura de 4°C, o plasma então obtido foi armazenado a uma temperatura de 80°C negativos para posterior análise, que foram realizadas em duplicata. Para verificar a ação dos antioxidantes alimentares foram utilizados os seguintes métodos: sulfidril, que mede tiols reduzidos e a capacidade antioxidante de proteínas e peptídeos e FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*), que mede a capacidade antioxidante não enzimática do plasma. Essas análises foram realizadas no Laboratório do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Sulfidril plasmático total

O plasma (45 µL) foi misturado com 120 ml de PBS e 35 ml de tampão Tris (30mM)/EDTA 3 mM (pH 8) em microplaca. Após a leitura da absorbância basal (412 nm), as amostras foram reagidas com 10 ml de 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (10 mM em etanol) por uma hora. Após, as amostras foram lidas novamente e a leitura basal foi descontada. Esses valores foram comparados com os valores obtidos em uma curva padrão, feita a partir de concentrações conhecidas de sulfidril. Os resultados foram expressos como nmol -SH/mg de proteína, conforme anteriormente descrito ²⁶.

FRAP (do ingles Ferric Reducing Ability of Plasma)

Esta técnica é capaz de detectar a capacidade antioxidante não enzimática do plasma, a partir da habilidade plasmática em reduzir o Fe (III) → Fe (II), gerando cor. Para tanto, 7 ml do plasma foram diluídos com 18 ml de H₂O destilada e posteriormente reagidos com 175 ml do reagente de trabalho do FRAP. Este reagente é constituído de 10

partes de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), uma parte de 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (10 mM em 40 mM HCl), e uma parte de FeCl₃ (20 mM). Uma curva padrão de FeSO₄ foi feita em paralelo e as absorbâncias foram lidas após 10 minutos de reação (593 nm). As absorbâncias das amostras foram comparadas com aquelas da curva padrão e os resultados foram expressos em mmol/litro de plasma, conforme descrito anteriormente²⁷.

Análise Estatística

Para detectar uma diferença de 25% nos valores de FRAP entre os grupos ao final da intervenção, considerando um $\alpha = 0,05$ e um poder de 80% foi estimada uma amostra de 15 pacientes por grupo (total de 30 pacientes). As variáveis contínuas com distribuição paramétrica foram descritas como média \pm desvio-padrão e analisadas pelo modelo de equações de estimativas generalizadas (GEE – *Generalized Estimating Equations*)²⁸, ao longo do tempo, para os dois grupos. Os dados categóricos foram apresentados como frequências e as suas diferenças foram analisadas pelo teste do qui-quadrado ou o teste Exato de Fischer. Foi utilizado o teste sequencial com correção de Bonferroni para verificar a diferença entre os grupos nas variáveis: calorias totais, carboidratos, proteínas totais, lipídios totais e fibras. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. A análise estatística foi realizada pelo programa SPSS, versão 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

RESULTADOS

Dos 71 pacientes elegíveis para o estudo, 22 foram excluídos por impossibilidade de comparecer às consultas de acompanhamento. Quarenta e nove pacientes foram randomizados, sendo que 10 pacientes desistiram de seguir o estudo e seis não chegaram ao final. Trinta e três pacientes terminaram o estudo e foram alocados para um dos dois grupos; dieta normal e dieta antioxidante (AOX).

A tabela 2 apresenta as características clínicas e antropométricas dos pacientes. Os grupos apresentam características similares, com predomínio do sexo feminino. A maior parte dos pacientes era tabagista, ou foi no passado. Os pacientes dos dois grupos eram hipertensos e faziam uso de medicação. No grupo dieta AOX, os pacientes referiam fazer mais atividade física.

A tabela 3 apresenta a estimativa de ingestão de calorias e macronutrientes basal antes do início da dieta, obtida no recordatório de 24 horas. No grupo controle, os pacientes apresentaram uma ingestão energética maior do que no grupo intervenção (AOX)

($p=0,088$), assim como de carboidratos ($p=0,047$) e fibras ($p=0,026$). A orientação nutricional ao longo do estudo resultou numa redução significativa na ingestão de calorias totais ($p=0,002$), proteínas totais e lipídios totais ao longo dos seis meses do acompanhamento clínico. Por outro lado, a ingestão de fibras apresentou uma variação entre os grupos considerando o início e o término do seguimento, com aumento significativo no grupo dieta AOX ($p=0,045$) (Fig.1).

No perfil lipídico, verificou-se uma redução significativa dos níveis de LDL-colesterol com uma tendência à diminuição do colesterol total e aumento do HDL-colesterol nos pacientes submetidos à dieta AOX. O IMC apresentou uma discreta redução no grupo dieta AOX, assim como a obesidade central (Fig. 2). Nas figuras 3, 4 e 5 podemos observar o efeito da dieta antioxidante sobre a resposta inflamatória e sobre o estresse oxidativo. Não houve modificação significativa nos níveis de PCR, sulfidril e FRAP ao longo do período de acompanhamento na comparação entre os dois grupos.

DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos o impacto de uma dieta rica em antioxidantes nos marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes submetidos à angioplastia coronária com implante de *stent*. Até onde sabemos, esse é o primeiro estudo que avalia uma alimentação rica em antioxidantes nesse grupo de pacientes. Estudos prévios que avaliaram o benefício de dietas específicas, tais como a dieta DASH, demonstraram uma redução significativa de eventos cardiovasculares em pacientes que consomem níveis elevados de frutas, verduras e nozes, associados à redução da ingestão de sódio, laticínios e proteínas de origem animal²⁹. Benefícios cardiovasculares semelhantes, com diminuição do risco de infarto do miocárdio foram também obtidos com a chamada dieta do Mediterrâneo¹⁸. Entretanto, o papel da redução do estresse oxidativo através do consumo de nutrientes específicos para obtenção desse benefício cardiovascular associado às dietas DASH e do Mediterrâneo, não foi avaliado nestes estudos. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o potencial benefício cardiovascular encontrado nas dietas DASH e do Mediterrâneo podem não estar relacionados à redução do estresse oxidativo.

Estudos clínicos que avaliaram os benefícios da suplementação de vitaminas antioxidantes, C e E, mostraram efeito positivo nos desfechos secundários. Num estudo randomizado duplo-cego, com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação de vitaminas C e E na função endotelial e aterosclerose, em pacientes submetidos a

transplante cardíaco, Fang e cols.¹³ randomizaram os pacientes após o transplante para um dos dois grupos: vitamina E (400 UI) duas vezes ao dia e vitamina C (500 mg) duas vezes ao dia; ou placebo, num período de seguimento de um ano. Ao final da pesquisa, os efeitos foram positivos para retardar a aterosclerose após o transplante cardíaco. Por outro lado, estudos que avaliaram o impacto da suplementação de vitaminas antioxidantes falharam em demonstrar os benefícios do uso de multivitamínicos na redução de desfechos cardiovasculares adversos, tais como, infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico¹⁴.

No presente estudo, verificamos que os pacientes não conseguiram alcançar as recomendações de ingestão de flavonoides, possivelmente, razão pela qual não elevaram a quantidade de antioxidantes plasmáticos. Os pacientes que seguiram efetivamente a recomendação apresentaram o perfil antioxidante muito elevado, ultrapassando a média do grupo. É sabido que as recomendações dietéticas e a implementação de alterações no estilo de vida são muitas vezes difíceis de serem incorporadas na prática diária. No entanto, nosso estudo demonstrou que os indivíduos do grupo da dieta AOX apresentaram redução nos níveis de LDL-colesterol, assim como, redução na obesidade central, mesmo em condições da vida real, demonstrando que a dieta apresenta potencial benefício na redução dos fatores de risco.

Um estudo realizado por Szeto e cols.³⁰, avaliou indivíduos não vegetarianos e vegetarianos que faziam a dieta por um período de 5 a 55 anos. O grupo de vegetarianos apresentou baixos valores de proteína C-reativa, indicando que uma dieta vegetariana, rica em antioxidantes por longo tempo pode ser anti-inflamatória. O processo inflamatório tem um importante papel na aterosclerose⁵. Valores elevados de proteína C-reativa constitui um fator de risco independente para as doenças cardiovasculares e um indicador para a inflamação crônica³¹. O metabolismo da proteína C-reativa pode ser modulado, em primeiro lugar, pelos antioxidantes da dieta, mais do que por um único composto antioxidante, como no caso das vitaminas C e E. As propriedades anti-inflamatórias dessas vitaminas e outros compostos bioativos com capacidade antioxidante podem ser atribuídos à habilidade de modular a atividade do fator de transcrição nuclear NF-κB³². Num estudo randomizado, realizado por Alizadeh e cols.³³, com o objetivo de avaliar os benefícios de uma dieta com antioxidantes e a suplementação de L-arginina e selênio, os pesquisadores avaliaram mulheres em pré-menopausa e obesidade central. Após seis semanas de seguimento, apenas o grupo com dieta enriquecida com vegetais apresentou redução dos

níveis de proteína C-reativa, porém, ao final do estudo, os valores de PCR voltaram aos níveis basais.

Os pacientes do nosso estudo apresentaram uma discreta elevação nos valores dos marcadores de estresse oxidativo, FRAP e sulfidril. O FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) é um método de análise de estresse oxidativo que mede compostos que liberam efeitos antioxidantes através da reação de transferência de elétrons, portanto, mede compostos que tem propriedades redutoras, como o ácido ascórbico e outros compostos fenólicos, embora não meçam moléculas de baixo peso molecular como compostos sulfidril³⁴. Um estudo realizado por Valtueña e cols.³⁵ com indivíduos que receberam uma dieta rica em antioxidantes por um período de duas semanas, não demonstrou elevação no status antioxidante medido através do FRAP no grupo que recebeu a dieta. É possível que os métodos utilizados para verificar essa elevação não demonstram a real biodisponibilidade dos alimentos ricos em antioxidantes³⁶.

Os dados do nosso estudo demonstraram que o grupo submetido à dieta AOX apresentou uma redução significativa dos níveis de LDL-colesterol, quando comparado com os pacientes que fizeram a dieta controle. O colesterol é um componente estrutural essencial nas estruturas celulares, como a membrana celular e na constituição de hormônios, sais biliares e vitamina D³⁷. Os estoques de colesterol são vitais e atingem seus níveis através do metabolismo endógeno e da ingestão dietética. O LDL-colesterol é ligado a uma lipoproteína (Apo B), que é responsável por depositar colesterol nos tecidos e atua como ligante para os receptores de LDL-colesterol em várias células do organismo³⁸. A terapia para reduzir LDL-colesterol inclui alternativas medicamentosas e dietéticas. Estas estão relacionadas com a redução da ingestão de alimentos fontes de lipídios e o aumento da ingestão de frutas, verduras e fibras vegetais³⁹.

Podemos citar como limitações do estudo, a baixa adesão dos pacientes à dieta AOX, o que pode ter influenciado nos resultados, na medida em que o incremento dos antioxidantes na dieta nos níveis recomendados pudesse produzir melhores resultados nos marcadores. Porém, pode-se considerar um aspecto positivo do estudo, o fato da recomendação dietética ter sido feita nos moldes do atendimento clínico usual do paciente, espelhando a situação da vida cotidiana. Outra limitação é o tempo de seguimento (seis meses), pois sabemos que a mudança nos hábitos alimentares é uma atitude difícil que requer tempo de adaptação a todas as mudanças. Dessa forma, um tempo de seguimento

superior a seis meses talvez pudesse apresentar maior impacto nos marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo.

Nossos resultados sugerem que nas condições do experimento, uma dieta rica em alimentos antioxidantes à base de flavonoides não está associada com redução do perfil inflamatório avaliado através dos níveis de proteína C-reativa, tampouco em modificação do estresse oxidativo em pacientes submetidos à angioplastia coronariana com implante de *stent*. Em contrapartida, a dieta AOX resultou em redução significativa dos níveis de LDL-colesterol. Estudos com maior número de pacientes e com tempo de seguimento mais longo devem ser estimulados para verificar a real influência dos antioxidantes vegetais nos marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

1. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(11):7124-8.
2. Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med* 2010;14(4):840-60.
3. Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 2012;51C:15-25.
4. Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10(2):248-53.
5. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
6. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991;325(14):997-1001.
7. Farb A, Weber DK, Kolodgie FD, Burke AP, Virmani R. Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation*. 2002 Jun;105(25):2974-80.
8. Wainstein MV, Gonçalves SC, Zago AJ, Zenker R, Burtet R, Couto GeB, et al. Plasma endothelin-1 levels after coronary stenting in humans. *Am J Cardiol* 2003;92(10):1211-4.
9. Watkins ML, Erickson JD, Thun MJ, Mulinare J, Heath CW. Multivitamin use and mortality in a large prospective study. *Am J Epidemiol* 2000;152(2):149-62.
10. Muntwyler J, Hennekens CH, Manson JE, Buring JE, Gaziano JM. Vitamin supplement use in a low-risk population of US male physicians and subsequent cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2002;162(13):1472-6.
11. Osganian SK, Stampfer MJ, Rimm E, Spiegelman D, Hu FB, Manson JE, et al. Vitamin C and risk of coronary heart disease in women. *J Am Coll Cardiol* 2003;42(2):246-52.
12. Holmquist C, Larsson S, Wolk A, de Faire U. Multivitamin supplements are inversely associated with risk of myocardial infarction in men and women--Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP). *J Nutr* 2003;133(8):2650-4.
13. Fang JC, Kinlay S, Beltrame J, Hikiti H, Wainstein M, Behrendt D, et al. Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial. *Lancet* 2002;359(9312):1108-13.

14. Gaziano J SHDCWG, et al. Multivitamins in the prevention of cancer in men: The physicians health study II randomized controlled trial. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 2012;308(18):1871-80.
15. Lee IM, Cook NR, Gaziano JM, Gordon D, Ridker PM, Manson JE, et al. Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005;294(1):56-65.
16. Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JM, et al. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005;293(11):1338-47.
17. Sesso HD, Christen WG, Bubes V, Smith JP, MacFadyen J, Schvartz M, et al. Multivitamins in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA* 2012;308(17):1751-60.
18. Martínez-González MA, Fernández-Jarne E, Serrano-Martínez M, Martí A, Martínez JA, Martín-Moreno JM. Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score. *Eur J Nutr* 2002;41(4):153-60.
19. Garrow J, Webster J. Quetelet Index (w/h-2) As a measure of fatness. *International Journal of Obesity* 1985;9(2):147-53.
20. Lean M, Han T, Morrison C. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *British Medical Journal*. 1995 jul 15 1995;311(6998):158-61.
21. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (ATP III). *JAMA* 2001;285(19):2486-97.
22. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005;45(4):287-306.
23. Chun OK, Chung SJ, Song WO. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr* 2007;137(5):1244-52.
24. Bhagwat S, Haytowitz DB, Holden JM. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods - Release 3. In: Agriculture USDo, Service AR, Center BHNR, Laboratory ND, editors. Beltsville, Maryland2011.
25. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. 1972;18(6):499-502.
26. Riener CK, Kada G, Gruber HJ. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem* 2002;373(4-5):266-76.

27. Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 1996;239(1):70-6.
28. Ma Y, Mazumdar M, Memtsoudis SG. Beyond repeated-measures analysis of variance: advanced statistical methods for the analysis of longitudinal data in anesthesia research. *Reg Anesth Pain Med* 2012;37(1):99-105.
29. Fung TT, Chiuve SE, McCullough ML, Rexrode KM, Logroscino G, Hu FB. Adherence to a DASH-style diet and risk of coronary heart disease and stroke in women. *Arch Intern Med* 2008;168(7):713-20.
30. Szeto YT, Kwok TCY, Benzie IFF. Effects of a long-term vegetarian diet on biomarkers of antioxidant status and cardiovascular disease risk. *Nutrition* 2004 10;20(10):863-6.
31. Haffner SM. The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006;97(2A):3A-11A.
32. Palozza P, Serini S, Torsello A, Di Nicuolo F, Piccioni E, Ubaldi V, et al. Beta-carotene regulates NF-kappaB DNA-binding activity by a redox mechanism in human leukemia and colon adenocarcinoma cells. *J Nutr* 2003;133(2):381-8.
33. Alizadeh M, Safaeiyan A, Ostadrahimi A, Estakhri R, Daneghian S, Ghaffari A, et al. Effect of L-Arginine and Selenium Added to a Hypocaloric Diet Enriched with Legumes on Cardiovascular Disease Risk Factors in Women with Central Obesity: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2012;60(2):157-68.
34. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry* 1998;44(6):1309-15.
35. Franzini L, Ardigò D, Valtueña S, Pellegrini N, Del Rio D, Bianchi MA, et al. Food selection based on high total antioxidant capacity improves endothelial function in a low cardiovascular risk population. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2012 1;22(1):50-7.
36. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79(5):727-47.
37. Russell DW. Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc Drugs Ther* 1992;6(2):103-10.
38. Hill SA, McQueen MJ. Reverse cholesterol transport--a review of the process and its clinical implications. *Clin Biochem* 1997;30(7):517-25.
39. Howard Bv VHLHJ, et al. Low-fat dietary pattern and risk of cardiovascular disease: The women's health initiative randomized controlled dietary modification trial. *JAMA* 2006;295(6):655-66.

TABELAS

Tabela 1. Lista de alimentos indicados na dieta AOX.

Legenda. Dieta AOX: dieta antioxidante.

Grupos	Alimentos
Frutas	Uva preta, ameixa vermelha, laranja, lima, maçã, cereja, amora, morango
Vegetais	Pimentão vermelho, cebola, brócolis, couve, espinafre, radite, acelga, aipo, tomate cereja, beterraba, alface
Ervas e temperos	Pimenta vermelha, tomilho, cebolinha, erva-doce, orégano
Bebidas e infusos	Café, chá preto e chá verde, suco de uva
Gorduras	Azeite de oliva

Tabela 2. Distribuição das variáveis clínicas entre os grupos de randomização.

Legenda. Resultados em n (%) ou média \pm desvio-padrão. Dieta AOX: dieta antioxidante. IMC: Índice de Massa Corporal. AAS: ácido acetil salicílico. IECA: inibidores da enzima conversora da angiotensina. AT2: antagonista do receptor da angiotensina II. Colesterol HDL: high density lipoprotein. Colesterol LDL: low density lipoprotein. PCR-Proteína C-reativa. FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*).

Variável	Dieta controle	Dieta AOX	P
Sexo feminino	11 (64,7)	9 (56,3)	0,619
Idade, anos	58,5 ± 9,2	58,9 ± 7,9	0,893
Peso, kg	77,5 ± 15,8	73,3 ± 14,0	0,422
IMC, kg/m ²	28,8 ± 6,1	28,0 ± 3,3	0,611
Circunferência abdominal, cm	103,5 ± 11,2	98,7 ± 10,4	0,215
Hipertensão	17 (100)	16 (100)	1,000
Tabagismo ativo	6 (35,3)	2 (12,5)	0,225
Tabagismo no passado	11 (64,7)	10 (62,5)	1,000
Consumo de álcool	4 (23,5)	2 (12,5)	0,656
Atividade física >1h/semana	3 (17,6)	5 (31,3)	0,523
AAS	17 (100)	16 (100)	1,000
Clopidogrel	13 (76,5)	11 (68,8)	0,619
Ticlopidina	3 (17,6)	4 (25,0)	0,688
Estatina	17 (100)	16 (100)	1,000
Betabloqueador	11 (64,7)	11 (68,8)	1,000
Bloqueadores canais de Cálcio	3 (17,6)	5 (31,3)	0,438
IECA ou Antagonistas AT2	9 (52,9)	9 (56,3)	1,000
Colesterol total, mg/dl	186,5 ± 65,4	175 ± 33,0	0,525
Colesterol HDL, mg/dl	41,4 ± 11,2	46,6 ± 15,7	0,285
Colesterol LDL, mg/dl	119,5 ± 55,4	105,0 ± 29,9	0,354
Triglicerídeos, mg/dl	156,5 ± 53,5	118,1 ± 44,9	0,033
PCR, mg/l	4,39 ± 2,09	3,23 ± 2,62	0,167
Sulfidril, nmol -SH/mg	3,54 ± 0,96	3,47 ± 1,10	0,855
FRAP, mmol/l	943,7 ± 238,6	912,1 ± 243,8	0,736

Tabela 3. Ingestão dietética no basal.

Legenda: Resultados em média \pm desvio-padrão. Dieta AOX: dieta antioxidante.

Nutrientes	Dieta controle	Dieta AOX	P
Calorias	2444,05±636,98	2097,95±465,94	0,088
Carboidratos	312,22±69,12	268,10±51,58	0,047
Proteínas	119,89±44,21	97,15±33,08	0,106
Lipídios totais	84,56±29,71	74,90±25,50	0,325
Ácidos graxos saturados	9,64±2,82	10,06±3,10	0,687
Ácidos graxos polinsaturados	7,60±1,29	7,64±2,63	0,964
Ácidos graxos monoinsaturados	10,16±1,90	11,12±2,83	0,258
Colesterol	295,56±170,12	234,57±139,27	0,270
Flavonoides	27,66±5,35	30,32±9,99	0,344
Fibras	30,88±7,76	24,45±8,02	0,026

FIGURAS

Figura 1. Consumo médio diário de calorias, carboidratos, proteínas totais, lipídios totais e fibras na dieta entre os grupos controle e dieta AOX.

Legenda: a linha sólida representa os pacientes do grupo AOX e a linha pontilhada representa os pacientes do grupo controle. Grupo AOX: dieta antioxidante. Teste estatístico: (GEE – *Generalized Estimating Equations*).

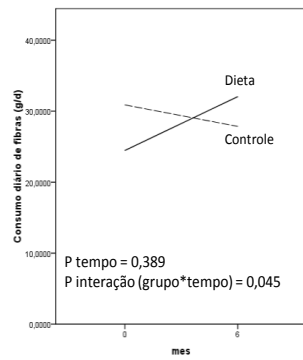
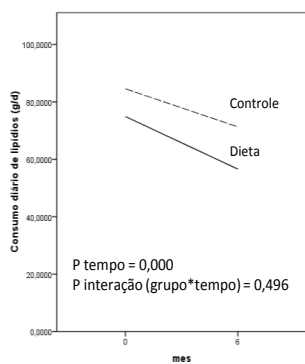
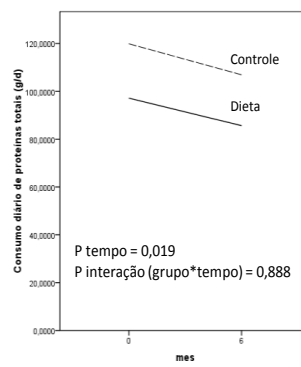
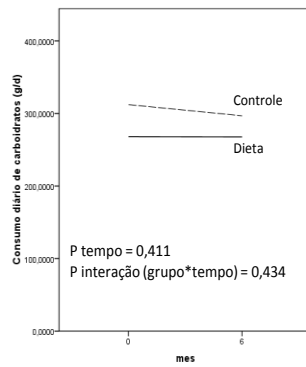
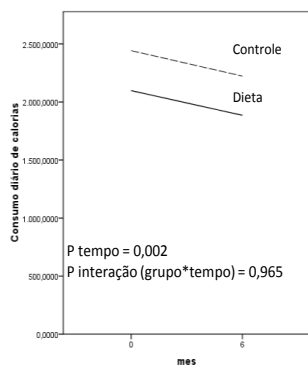


Figura 2. Efeito da dieta sobre variáveis antropométricas e metabólicas nos três momentos de aferição em ambos os grupos.

Legenda: IMC: Índice de massa corporal (peso/altura²); HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein. A linha sólida representa os pacientes do grupo AOX e a linha pontilhada representa os pacientes do grupo controle. Grupo AOX: dieta antioxidante. Teste estatístico: (GEE – *Generalized Estimating Equations*). *: P tempo = 0,016; P interação (grupo*tempo) = 0,046. Demais diferenças P > 0,05.

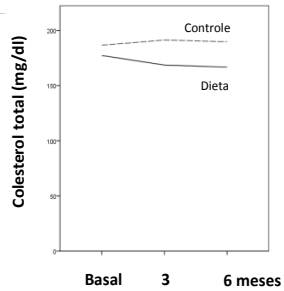
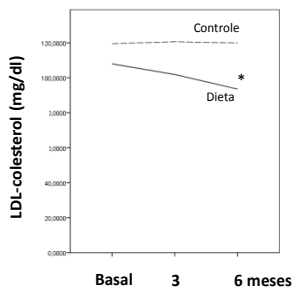
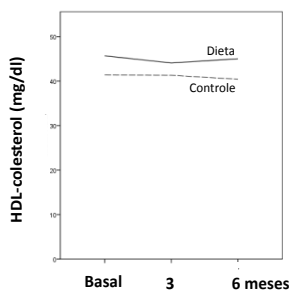
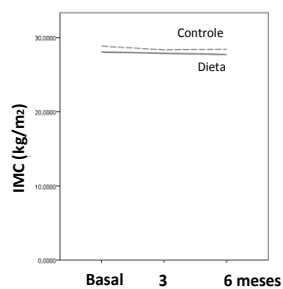
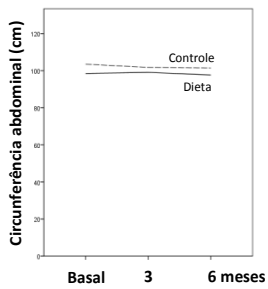
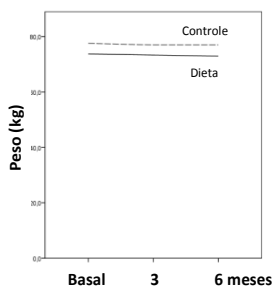


Figura 3. Efeito da dieta sobre os níveis de Proteína C Reativa nos três momentos de aferição em ambos os grupos.

Legenda: grupo controle e grupo dieta AOX. Teste estatístico: (GEE – *Generalized Estimating Equations*).

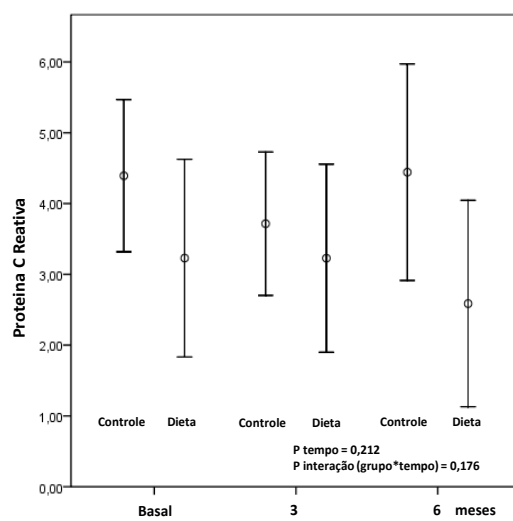


Figura 4. Efeito da dieta sobre os valores de grupos sulfidril nos três momentos de aferição em ambos os grupos.

Legenda: grupo controle e grupo dieta AOX. Teste estatístico: (GEE – *Generalized Estimating Equations*).

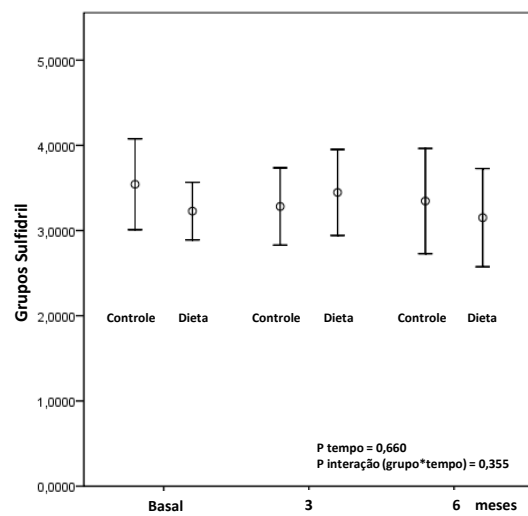
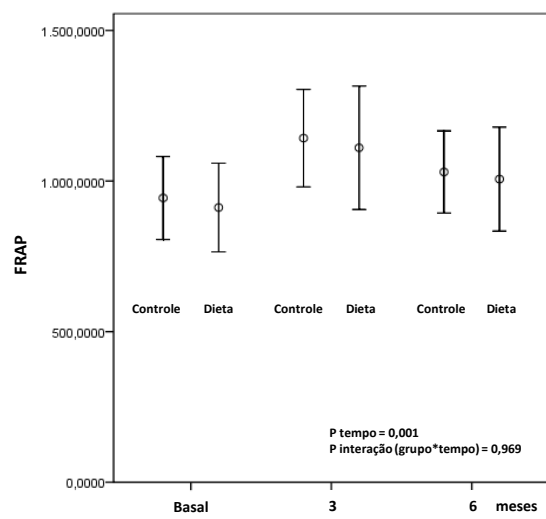


Figura 5. Efeito da dieta sobre os níveis de FRAP nos três momentos de aferição em ambos os grupos. FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*).

Legenda: grupo controle e grupo dieta AOX. Teste estatístico: (GEE – *Generalized Estimating Equations*).



ARTIGO EM INGLÊS

The effects of a flavonoid-rich diet on oxidative stress, inflammation and lipid profile after coronary angioplasty with stent placement: a randomized clinical trial

Cammerer, Magda Ambros (1), Gonçalves, Sandro Cadaval (2), Andrades, Michael Everton (2,3), Lopes, Amanda (3), Wainstein, Marco Vugman (1,2,4)

1. Graduate Program in Cardiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
2. Hospital de Clinicas de Porto Alegre
3. Experimental Research Center
4. Medical School. Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Running title: Oxidative stress and cardiovascular disease

Keywords: flavonoids, oxidative stress, LDL cholesterol, cardiovascular disease, diet, antioxidant food

Corresponding author:

Magda Ambros Cammerer

Rua Eça de Queirós, 349/701

Porto Alegre, RS 90670-020

Phone: +55 51 9806-3749

E-mail: magda.ambros@hotmail.com

The effects of a flavonoid-rich diet on oxidative stress, inflammation and lipid profile after coronary angioplasty with stent placement: a randomized clinical trial.

ABSTRACT

Introduction: Intake of antioxidant-rich foods may decrease oxidative stress and have a direct impact on atherosclerosis by reducing oxidized LDL.

Objectives: To assess the impact of a flavonoid-rich diet on oxidative stress, inflammatory response, and lipid profile in patients with cardiovascular disease after coronary angioplasty and stent placement.

Methods: Thirty-three patients who had undergone coronary angioplasty with stent placement were randomly allocated to follow a control diet (based on NCEP III recommendations) or an antioxidant diet (AOX) food sources rich in flavonoids, for 6 months. Dietary intake was recorded at the start and at the end of the follow-up period, as were oxidative stress (FRAP and protein sulphhydryl) levels and markers of inflammation (C-reactive protein).

Results: Dietary guidance led to a reduction in energy, carbohydrate, and lipid intake in the AOX group, as well as increased flavonoid intake. There were no changes in oxidative stress markers (FRAP and total sulphhydryl) or C-reactive protein in the AOX group, but there was a significant decrease in LDL cholesterol levels as compared with those of the control group.

Conclusion: The findings of this study suggest that a flavonoid-based, antioxidant-rich diet is not associated with reductions in oxidative stress or inflammatory markers after coronary angioplasty with stent placement, despite improvements in lipid profile.

Keywords: flavonoids, oxidative stress, LDL cholesterol, cardiovascular disease, diet, antioxidant food

INTRODUCTION

Oxidative stress is a physiological process that takes place during cellular metabolism and plays an important role in cell signaling, apoptosis, gene expression, and ion transport¹. However, excessive concentrations of reactive oxygen species (ROS) may have a detrimental effect on a wide range of molecules, including proteins, lipids, RNA, and DNA². Cells are usually capable of mounting a successful defense against ROS attack, but in times of stress, the amount of reactive species may increase to the point of causing cell damage³.

Oxidative stress may play a direct role in the pathogenesis of atherosclerosis, by means of oxidized LDL⁴, a constituent of atherosclerotic plaque that is involved in the progression of vessel lesions by increasing interactions between monocytes and endothelial cell, consequently stimulating smooth muscle cell proliferation and growth factor synthesis⁵. Coronary angioplasty constitutes a classical model of accelerated atherosclerosis⁶, the clinical consequence of which may be restenosis. Coronary stenting has been proven to reduce post-angioplasty restenosis by inhibiting negative vessel remodeling⁷. However, it also induces an inflammatory response, which has been associated with endothelial dysfunction⁸.

Attempts at controlling oxidative stress by means of antioxidant vitamin supplementation have yielded conflicting results. Observational studies on the use of multivitamins and the incidence of cardiovascular disease have been limited and inconsistent⁹⁻¹². Some clinical trials using surrogate endpoints such as improvement in endothelial function and reduction in atherosclerosis scores have shown favorable results with use of antioxidant vitamins¹³. However, large randomized trials have failed to demonstrate any benefit of antioxidant vitamin supplementation for the prevention of cardiovascular disease¹⁴⁻¹⁷.

So-called antioxidant diets based on flavonoid-rich foods (such as the Mediterranean diet) and moderate red wine intake may be associated with potential cardiovascular benefits¹⁸. However, no randomized clinical trials have been able to demonstrate actual decreases in oxidative stress as a result of such interventions. Therefore, the objective of the present study was to assess, in a randomized clinical trial setting, the impact of a flavonoid-rich diet on oxidative stress and markers of inflammation in patients with cardiovascular disease after coronary angioplasty and stenting.

METHODS

Study design and population

This was a randomized clinical trial of patients who underwent coronary angioplasty and stent placement at the Interventional Cardiology Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, Brazil. The study protocol was approved by the local Research Ethics Committee (protocol 06-327).

The study population comprised male and female patients between the ages of 18 and 75 years with indications for elective coronary angioplasty and non–drug-eluting stent placement. Patients with acute myocardial infarction or acute coronary syndrome, chronic kidney failure, severe congestive heart failure (NYHA functional class III/IV), neoplastic disease, inflammatory connective tissue disease, or diabetes mellitus were excluded from the sample, as were pregnant women.

Trial protocol

Coronary angioplasty and stenting were performed in accordance with routine hospital protocols and as indicated by the attending physician. All patients received ticlopidine or clopidogrel + aspirin before the procedure and heparin (100 IU/kg) during the procedure. Patients who were on glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists as adjuvant therapy were given 70% of the standard heparin dose for a target activated clotting time of 200–250 seconds. All patients were prescribed simvastatin 40 mg/day, ticlopidine 250 mg q12h (or clopidogrel 75 mg/day) and aspirin 100 mg/day as maintenance therapy. After intervention, patients were informed of the study and its intentions and invited to take part. Those who agreed then signed an informed consent form and were given further information on the follow-up portion of the study, which consisted of a series of outpatient visits.

A 10-mL blood sample was collected from each patient and sent for lipid profile and C-reactive protein measurement at the study facility laboratory. For analysis of oxidative stress markers (sulfhydryl and FRAP), samples were collected into heparinized tubes, immediately placed on ice, and centrifuged for 10 minutes at 3000 RPM and 4°C within 60 minutes of collection. The plasma thus obtained was stored at –80°C for later testing.

Randomization

Fourteen days after percutaneous coronary intervention, each patient's first outpatient follow-up visit was scheduled. These visits consisted of anthropometric assessment, patient allocation, and administration of a 24-hour dietary recall. After these procedures, patients were randomly allocated to the intervention or control group according to a computer-generated random number table.

Patients in the intervention group were instructed to follow a flavonoid-rich diet meeting their nutritional needs (AOX diet, further details below), whereas those in the control group received dietary guidance meant to help them maintain their current nutritional status. All patients were given utensils for accurate measurement of food and beverage portions, including a serving spoon, a 250-mL plastic measuring cup, and a medium-sized plate.

Further assessments were carried out at 3- and 6-month follow-up (lipid profile, 24-hour dietary recall, 3-day food diary, and measurement of anthropometric parameters). At each of these visits, a 10-mL blood sample was collected for measurement of oxidative stress and inflammation markers and lipid profile assessment.

Anthropometric assessment

Anthropometric parameters (weight, height, and waist circumference) were measured at each study visit. Weight and height were measured with the aid of anthropometric scales and the Body Mass Index (BMI) calculated using the classic Quetelet index formula (current body mass divided by the square of the height)¹⁹. Waist circumference was measured at the midpoint between the iliac crest and lowest rib²⁰.

Dietary monitoring

Patients allocated to the intervention group were prescribed an energy-adequate diet based on NCEP ATP III recommendations²¹ and rich in antioxidant-containing foods, such as cruciferous vegetables, onions, cherry tomatoes, and grapes, for a recommended daily intake of 40 mg/day antioxidant compounds (AOX diet), for six months. Patients allocated to the control group received conventional dietary guidance, also for an energy-adequate diet based on NCEP ATP III recommendations, through an informative leaflet and 6 months of follow-up.

Diets were tailored individually to the nutritional needs, socioeconomic status, and dietary habits of each patient. However, all consisted of 60% carbohydrates (no more than 10% simple carbohydrates), 15% protein, and up to 25% fat (excess saturated fat was to be avoided). The maximum daily cholesterol intake was set at 200 mg, the recommended dietary fiber intake at 20–30 g/day and patients were encouraged to drink water between meals. Patients were instructed to take five or six meals a day (three main meals and two or three light snacks between them), preferably at home. A list of flavonoid-rich foods, which were to be consumed four times a day, distributed across meals or snacks, was provided (Table 1). Patients were also given guidance on food preparation: vegetables were to be consumed raw whenever possible or cooked if necessary, whereas fruit was only to be consumed raw.

Information on food intake was collected by means of a 24-hour dietary recall. Furthermore, patients were instructed to keep a 3-day food diary over the course of two weekdays and one Saturday or Sunday. The utensils provided at the start of the study were used for measurement of food portions. Any household measurements were converted to grams or milligrams. Food intake was calculated with the *Programa de Apoio à Nutrição da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP) 1.6* software package. Calculation of flavonoid intake was based on the USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods²².

Lipid profile

Lipid profile was assessed by means of total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol and triglyceride measurements. Blood samples were collected after a 12-hour fast. Total cholesterol and triglycerides were measured with enzymatic colorimetric assays (ADVIA 1800, Merck), and HDL cholesterol, with the homogeneous enzymatic colorimetric method (ADVIA 1800, Merck). LDL cholesterol was calculated with the Friedewald equation²³, and C-reactive protein was determined using an ultrasensitive turbidimetric method (ADVIA 1800, Merck).

Oxidative stress

After collection, blood samples were centrifuged for 10 minutes at 3000 RPM and 4°C and the plasma thus obtained was stored at –80°C for later testing, which was performed in duplicate. Two assays were used for assessment of the impact of dietary

antioxidants on oxidative stress: the sulfhydryl assay, which measures reduced thiol groups and, consequently, the antioxidant activity of proteins and peptides, and the FRAP (ferric reducing ability of plasma) assay, which measures the non-enzymatic antioxidant activity of plasma. All tests were performed at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Experimental Research Center Laboratory.

Total protein sulphhydryl

Briefly, 45mL of plasma was mixed with 120mL PBS and 35mL of 30mM Tris/3mM EDTA (pH 8) in a microplate well. After reading baseline absorbances (412nm), samples were reacted with 10mL 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (10mM in ethanol) for 1 hour. Samples were read again (412nm) and baseline absorbances were discounted. The obtained values were compared with those obtained with a sulphhydryl standard curve and results were expressed as nmol-SH/mg protein, as described elsewhere ²⁴.

FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

The FRAP assay is able to detect non-enzymatic antioxidants present in plasma. It is based on plasma-mediated ferric reduction. Briefly, 7mL of plasma was mixed with 18mL distilled water and reacted with 175mL of FRAP reagent for 10 min. FRAP reagent is prepared as required by mixing 10mL acetate buffer (300mM, pH 3.6), 1mL 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine (10mM in 40mM HCl), and 1mL 20mM FeCl₃. A standard curve was built out of Fe(II) and run in parallel and absorbances were read at 593nm. Results are expressed as mmol/L of plasma, as described elsewhere ²⁵.

Statistical analysis

To detect a 25% difference in FRAP values between groups at the end of the intervention, considering an $\alpha = 0.05$ and a power of 80% was estimated a sample of 15 patients per group (total 30 patients). Continuous variables with parametric distribution were described as mean \pm standard deviation and analyzed by the model of generalized estimating equations (GEE) ²⁸, over time, for both groups. Categorical data were presented as frequencies and their differences were analyzed by chi-square or Fisher exact test. It was used sequential Bonferroni correction to detect differences between groups in

variables: total calories, carbohydrates, protein, total fat and fiber. A p value of <0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using SPSS, version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

RESULTS

Of the 71 eligible patients, 22 were excluded due to inability to attend follow-up visits. Forty-nine patients were randomized; of these, 10 dropped out over the course of the study and six were unable to complete it. Therefore, 33 patients completed the trial after allocation to one of the two study groups, normal (control) diet or antioxidant (AOX) diet.

Table 2 describes the clinical and anthropometric profile of the study sample. Groups were broadly homogeneous, with a female predominance and a majority of smokers (past or current) in the control group. In both groups, most patients were hypertensive and on antihypertensive agents; in the AOX group, patients reported greater engagement in physical activity. There were slight reductions in BMI and central obesity in the AOX diet group.

Table 3 shows estimated calorie and macronutrient intakes as calculated from 24-hour dietary recalls. Patients in the control group had a higher total energy intake than those in the intervention (AOX) group ($p=0.088$), as well as a higher total carbohydrate intake ($p=0.047$). Analysis of dietary intake showed a significant reduction in total calorie intake ($p=0.002$), total protein, and total fat intake in the AOX diet group over the 6-month follow-up period. Conversely, at the end of follow-up, fiber intake had increased significantly from baseline in the AOX group ($p=0.045$) (Figure 1).

Regarding lipid profile, significant reductions in LDL cholesterol were observed in the AOX group, as well as a trend toward lower total cholesterol and higher HDL cholesterol levels (Figure 2). Figures 3, 4, and 5 demonstrate the impact of the AOX diet on inflammatory response and oxidative stress markers. On between-group comparison, there were no significant changes in CRP, sulphhydryl, or FRAP levels at any point during the follow-up period.

DISCUSSION

This clinical trial assessed the impact of an antioxidant-rich diet on markers of inflammation and oxidative stress after coronary angioplasty with stent placement. To the best of our knowledge, this was the first study on the effects of antioxidant-rich diet in this patient population. Previous studies of the potential benefits of specific diets, such as the DASH diet, have demonstrated significant reductions in cardiovascular events among patients who eat plenty of fruit, vegetables, and nuts while concomitantly limiting their intake of sodium, dairy, and protein from animal sources ²⁶. Similar cardiovascular benefits, with decreased risk of myocardial infarction, have been reported with the so-called Mediterranean diet ¹⁸. However, these studies did not assess the role of improvement in oxidative stress as a result of specific nutrient intake in reduction of cardiovascular risk. Our findings suggest that the potential cardiovascular benefits of the DASH and Mediterranean diets may not be the result of a reduction in oxidative stress.

Clinical trials on the benefit of antioxidant vitamin (C and E) supplementation have shown positive effects on secondary endpoints. In a randomized double-blind clinical trial designed to assess the effects of vitamin C and vitamin E supplementation on endothelial function and atherosclerosis in heart transplant recipients ¹³, patients were randomly allocated to receive vitamin E (400 UI) and vitamin C (500 mg) twice daily or placebo for 1 year. At the end of the trial period, patients in the intervention group exhibited slower progression of atherosclerosis. Conversely, studies have failed to show any benefit from multivitamin use in the reduction of adverse cardiovascular events, such as myocardial infarction and stroke ¹⁴.

In the present study, patients were unable to reach recommended flavonoid intake levels, which may account for the lack of elevation in plasma antioxidant levels. Patients who successfully adhered to our recommendations exhibited very high antioxidant profiles, far above the AOX group average. It is widely known that implementation of dietary recommendations and lifestyle changes in daily practice is extremely challenging. However, our study did show that patients in the AOX diet group experienced reductions in LDL cholesterol levels and central obesity, even under the aforementioned real-life conditions, which demonstrates the potential benefit of this diet in mitigating risk factors.

A study conducted by Szeto et al.²⁷ assessed vegetarian and non-vegetarian subjects who had followed their diets for a period of 5 to 55 years. Subjects in the vegetarian group had low C-reactive protein levels; this suggests that long-term adherence to an antioxidant-rich vegetarian diet may have an anti-inflammatory effect. The process of inflammation plays a major role in atherosclerosis⁵. High C-reactive protein levels are an independent risk factor for cardiovascular disease and a marker of chronic inflammation²⁸. C-reactive protein metabolism can be modulated by antioxidants, with overall dietary antioxidants playing a greater role than any one antioxidant compound (such as vitamins C or E). The anti-inflammatory properties of these vitamins and of other bioactive compounds with antioxidant activity are attributable to their effect as modulators of NF- κ B (nuclear transcription factor kappa B) activity. Alizadeh et al. conducted a randomized trial designed to assess the benefits of an antioxidant-rich diet and L-arginine and selenium supplementation in premenopausal women with central obesity²⁹. At 6-week follow-up, only patients on a vegetable-enriched diet exhibited reductions in C-reactive protein levels.

The patients in our sample experienced slight increases in their levels of the oxidative stress markers FRAP and sulfhydryl. FRAP (ferric reducing ability of plasma) is an assay that measures the concentrations of compounds that exert antioxidant effects by means of electron transfer reactions—in other words, compounds with reducing properties, such as ascorbic acid and phenolic compounds; it does not detect low-molecular-weight compounds, such as thiols³⁰. A study by Valtueña et al.³¹ of subjects who were fed an antioxidant-rich diet for 2 weeks did not detect any increases in antioxidant status, as measured by FRAP, in the intervention group. It is possible that assays used to determine this increase fail to demonstrate the actual bioavailability of antioxidant-rich foods³².

Our findings showed a significant reduction in LDL cholesterol levels among patients in the AOX diet group as compared with controls. Cholesterol is an essential structural component of the cell membrane and a fundamental constituent of several hormones, bile salts, and vitamin D. Cholesterol stores are of vital importance, and are replenished both by endogenous metabolism and by dietary cholesterol intake. LDL cholesterol is bound to a lipoprotein (Apo B) that is responsible for tissue cholesterol deposition and acts as the ligand of LDL cholesterol receptors in a wide range of cells. LDL-reducing therapy may consist of both pharmacological and dietary measures. The

latter include reduction of lipid-rich food intake and increased intake of fruit, vegetables, and dietary fiber ³³.

The limitations of this study include poor adherence to the AOX diet, which may have skewed results, as an increase in dietary antioxidant intake to actual recommended levels might have had a greater positive impact on the biomarkers of interest. Conversely, a positive aspect of the trial protocol is that dietary guidance was provided within the framework of regular clinical follow-up, mirroring a real-life situation rather than a research setting. Another limitation was the relatively short length of follow-up (6 months), as it is widely known that changing dietary habits is a challenging practice to which patients may be slow to adapt. Therefore, a longer follow-up period (>6 months) might show a greater impact on markers of inflammation and oxidative stress.

Our results suggest that adherence to a diet rich in flavonoid-based, antioxidant foods is not associated with a reduction in inflammation (as assessed by C-reactive protein concentrations), nor does it modify oxidative stress levels in patients who have undergone percutaneous coronary intervention with stent placement. Further studies with larger sample size and longer follow-up periods are encouraged to assess the real impact of vegetable antioxidant intake on markers of inflammation and oxidative stress.

REFERENCES

1. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(11):7124-8.
2. Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med* 2010;14(4):840-60.
3. Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 2012;51C:15-25.
4. Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10(2):248-53.
5. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
6. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991;325(14):997-1001.
7. Farb A, Weber DK, Kolodgie FD, Burke AP, Virmani R. Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation* 2002;105(25):2974-80.
8. Wainstein MV, Gonçalves SC, Zago AJ, Zenker R, Burtet R, Couto GeB, et al. Plasma endothelin-1 levels after coronary stenting in humans. *Am J Cardiol* 2003;92(10):1211-4.
9. Watkins ML, Erickson JD, Thun MJ, Mulinare J, Heath CW. Multivitamin use and mortality in a large prospective study. *Am J Epidemiol* 2000;152(2):149-62.
10. Muntwyler J, Hennekens CH, Manson JE, Buring JE, Gaziano JM. Vitamin supplement use in a low-risk population of US male physicians and subsequent cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2002;162(13):1472-6.
11. Osganian SK, Stampfer MJ, Rimm E, Spiegelman D, Hu FB, Manson JE, et al. Vitamin C and risk of coronary heart disease in women. *J Am Coll Cardiol* 2003;42(2):246-52.
12. Holmquist C, Larsson S, Wolk A, de Faire U. Multivitamin supplements are inversely associated with risk of myocardial infarction in men and women--Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP). *J Nutr* 2003;133(8):2650-4.
13. Fang JC, Kinlay S, Beltrame J, Hikiti H, Wainstein M, Behrendt D, et al. Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial. *Lancet* 2002;359(9312):1108-13.

14. Gaziano J SHDCWG, et al. Multivitamins in the prevention of cancer in men: The physicians; health study II randomized controlled trial. *JAMA* 2012;308(18):1871-80.
15. Lee IM, Cook NR, Gaziano JM, Gordon D, Ridker PM, Manson JE, et al. Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2005;294(1):56-65.
16. Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JM, et al. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005;293(11):1338-47.
17. Sesso HD, Christen WG, Bubes V, Smith JP, MacFadyen J, Schvartz M, et al. Multivitamins in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA* 2012;308(17):1751-60.
18. Martínez-González MA, Fernández-Jarne E, Serrano-Martínez M, Martí A, Martínez JA, Martín-Moreno JM. Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score. *Eur J Nutr* 2002;41(4):153-60.
19. Garrow J, Webster J. Quetelet Index (w/h-2) As a measure of fatness. *International Journal of Obesity* 1985;9(2):147-53.
20. Lean M, Han T, Morrison C. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *British Medical Journal* 1995;311(6998):158-61.
21. Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285(19):2486-97.
22. Bhagwat S, Haytowitz DB, Holden JM. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods - Release 3. In: Agriculture USDo, Service AR, Center BHNR, Laboratory ND, editors. Beltsville, Maryland 2011.
23. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972;18(6):499-502.
24. Riener CK, Kada G, Gruber HJ. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem* 2002;373(4-5):266-76.
25. Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 1996;239(1):70-6.
26. Fung TT, Chiuve SE, McCullough ML, Rexrode KM, Logroscino G, Hu FB. Adherence to a DASH-style diet and risk of coronary heart disease and stroke in women. *Arch Intern Med* 2008;168(7):713-20.

27. Szeto YT, Kwok TCY, Benzie IFF. Effects of a long-term vegetarian diet on biomarkers of antioxidant status and cardiovascular disease risk. *Nutrition* 2004 10;20(10):863-6.
28. Haffner SM. The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006;97(2A):3A-11A.
29. Alizadeh M, Safaeiyan A, Ostadrahimi A, Estakhri R, Daneghian S, Ghaffari A, et al. Effect of L-Arginine and Selenium Added to a Hypocaloric Diet Enriched with Legumes on Cardiovascular Disease Risk Factors in Women with Central Obesity: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2012;60(2):157-68.
30. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry* 1998;44(6):1309-15.
31. Franzini L, Ardigò D, Valtueña S, Pellegrini N, Del Rio D, Bianchi MA, et al. Food selection based on high total antioxidant capacity improves endothelial function in a low cardiovascular risk population. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2012 1;22(1):50-7.
32. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79(5):727-47.
33. Howard BV, et al. Low-fat dietary pattern and risk of cardiovascular disease: The women's health initiative randomized controlled dietary modification trial. *JAMA* 2006;295(6):655-66.

TABLES

Table 1. Recommended foods in the AOX diet.

Legend: AOX diet. Antioxidant diet.

Food group	Foods
Fruit	Black grapes, red plums, oranges, lemons, apples, cherries, berries, strawberries
Vegetables	Red bell peppers, onions, broccoli, kale, collard greens, spinach, radicchio, chard, celery, cherry tomatoes, beets, lettuce
Herbs and spices	Chili pepper, thyme, chive, fennel, oregano
Beverages	Coffee, black tea, green tea, grape juice
Fats	Olive oil

Table 2. Distribution of clinical variables in the control and intervention (AOX) groups.

Legend: Results in n (%) or mean \pm standard deviation. AOX diet: antioxidant diet. BMI: Body Mass Index. AAS: acetylsalicylic acid. ACE: angiotensin-converting enzyme inhibitors. AT2: receptor antagonist of angiotensin II. HDL: high density lipoprotein. LDL: low density lipoprotein. CRP C-reactive protein. FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma).

Variable	Control diet	AOX diet	P
Female sex	11 (64.7)	9 (56.3)	0.619
Age (years)	58.5 ± 9.2	58.9 ± 7.9	0.893
Weight (kg)	77.5 ± 15.8	73.3 ± 14.0	0.422
BMI (kg/m ²)	28.8 ± 6.1	28.0 ± 3.3	0.611
Waist circumference (cm)	103.5 ± 11.2	98.7 ± 10.4	0.215
Hypertension	17 (100)	16 (100)	1.000
Smoking, current	6 (35.3)	2 (12.5)	0.225
Smoking, past	11 (64.7)	10 (62.5)	1.000
Alcohol intake	4 (23.5)	2 (12.5)	0.656
Physical activity >1h/w	3 (17.6)	5 (31.3)	0.523
Aspirin use	17 (100)	16 (100)	1.000
Clopidogrel use	13 (76.5)	11 (68.8)	0.619
Ticlopidine use	3 (17.6)	4 (25.0)	0.688
Statin use	17 (100)	16 (100)	1.000
Beta-blocker use	11 (64.7)	11 (68.8)	1.000
Calcium channel blocker use	3 (17.6)	5 (31.3)	0.438
ACE inhibitor or ARB use	9 (52.9)	9 (56.3)	1.000
Cholesterol, total, mg/dL	186.5 ± 65.4	175 ± 33.0	0.525
Cholesterol, HDL, mg/dL	41.4 ± 11.2	46.6 ± 15.7	0.285
Cholesterol, LDL, mg/dL	119.5 ± 55.4	105.0 ± 29.9	0.354
Triglycerides, mg/dL	156.5 ± 53.5	118.1 ± 44.9	0.033
CRP, mg/L	4.39 ± 2.09	3.23 ± 2.62	0.167
Sulfhydryl, nmol-SH/mg	3.54 ± 0.96	3.47 ± 1.10	0.855
FRAP, mmol/L	943.7 ± 238.6	912.1 ± 243.8	0.736

Table 3. Baseline dietary intake.

Legend: Results as mean \pm standard deviation. AOX diet. Antioxidant diet.

Nutrient	Control diet	AOX diet	P
Calories	2444.05±636.98	2097.95±465.94	0.088
Carbohydrates	312.22±69.12	268.10±51.58	0.047
Protein	119.89±44.21	97.15±33.08	0.166
Total fat	84.56±29.71	74.90±25.50	0.325
Saturated fat	9.64±2.82	10.06±3.10	0.607
Polyunsaturated fat	7.60±1.29	7.64±2.63	0.964
Monounsaturated fat	10.16±1.90	11.12±2.83	0.258
Cholesterol	295.56±170.12	234.57±139.27	0.270
Flavonoids	27.66±5.35	30.32±9.99	0.354
Dietary fiber	30.88±7.76	24.45±8.02	0.026

FIGURES

Figure 1. Average daily intake of calories, carbohydrates, protein, total fat and dietary fiber between the control diet and AOX.

Legend: solid line represents patients in group AOX and the dotted line represents the control group patients. Group AOX: antioxidant diet. Statistical test: (GEE - Generalized Estimating Equations).

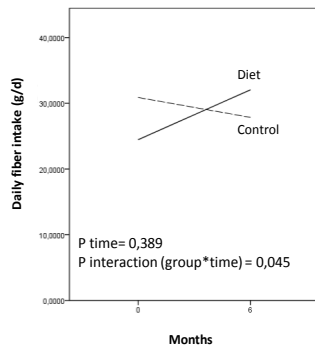
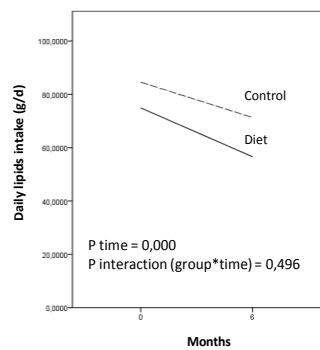
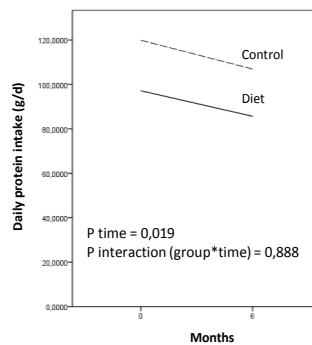
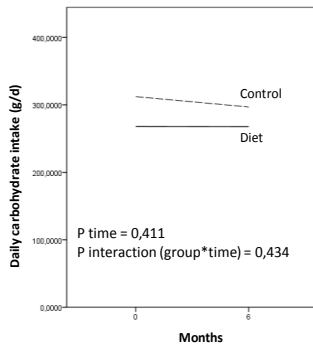
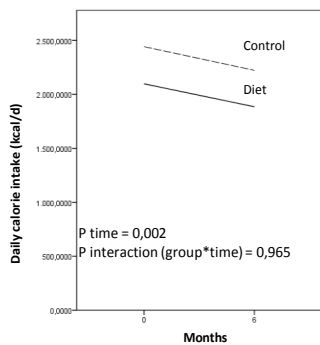


Figure 2. Effect of diet on anthropometric and metabolic variables at the three measurement in both groups.

Legend: BMI: Body mass index (weight/height²), HDL: high density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein. The solid line represents patients in group AOX and the dotted line represents the control group patients. Group AOX: antioxidant diet. Statistical test: (GEE - Generalized Estimating Equations). *: Time $P = 0.016$, P interaction (group * time) = 0.046. Other differences $P > 0.05$.

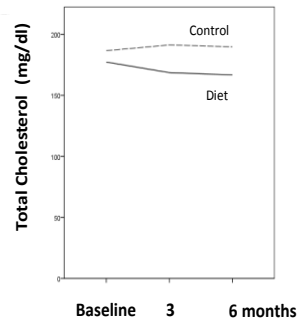
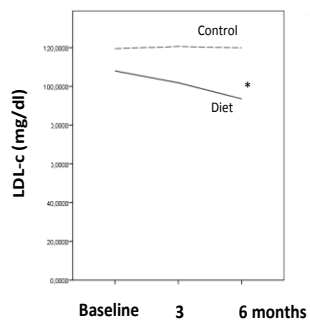
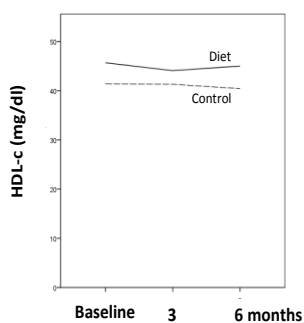
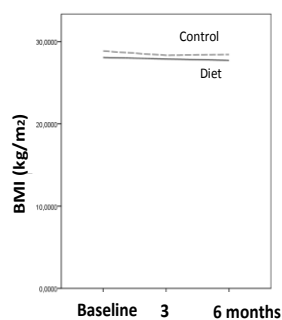
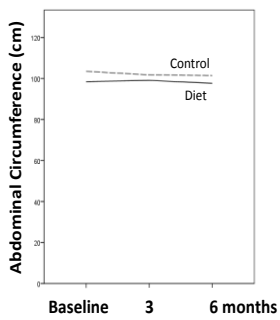
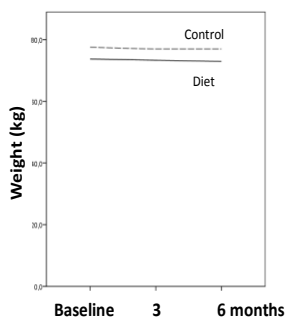


Figure 3. Effect of diet on levels of C-reactive protein at the three measurement in both groups.

Legend: control diet group and AOX. Statistical test: (GEE - Generalized Estimating Equations).

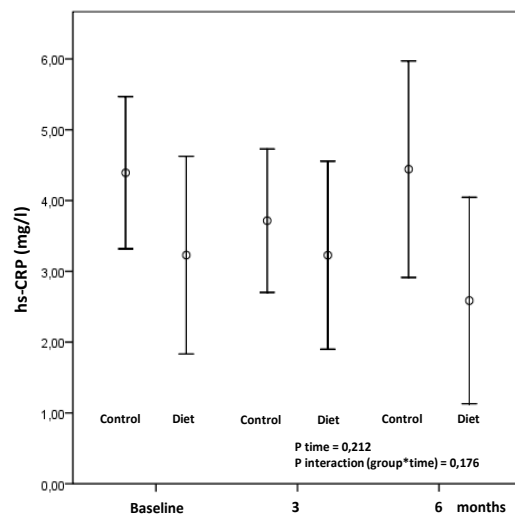


Figure 4. Effect of diet on levels of Sulphydryl at the three measurement in both groups.

Legend: control diet group and AOX. Statistical test: (GEE - Generalized Estimating Equations).

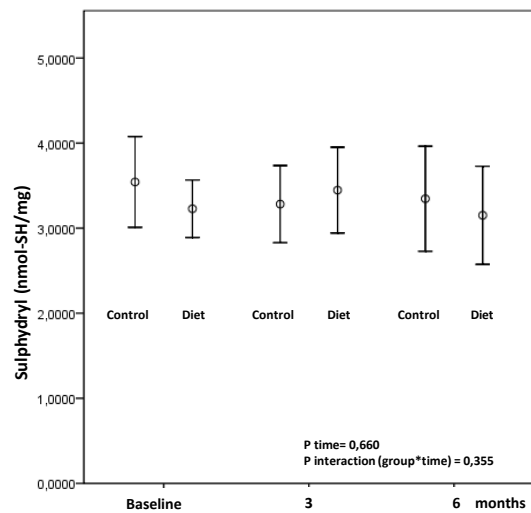
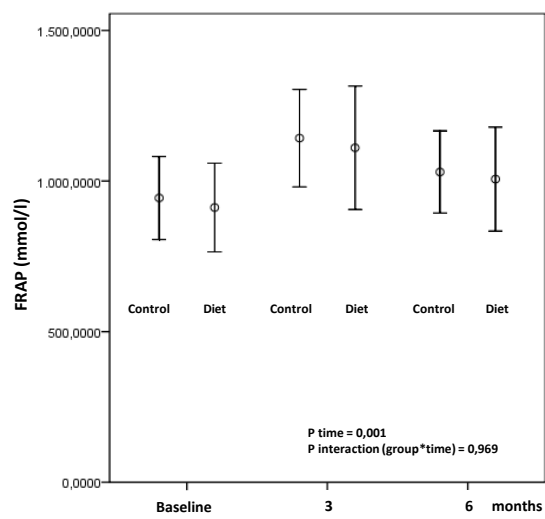


Figure 5. Effect of diet on levels of FRAP at the three measurement in both groups.

Legend: control diet group and AOX. Statistical test: (GEE - Generalized Estimating Equations).



TERMO DE CONSENTIMENTO

Protocolo: Impacto da dieta rica em substâncias antioxidantes na restenose após implante de stent.

Investigador Principal: Dr. Marco V. Wainstein

Co-investigadores: Magda Ambros Cammerer

OBJETIVOS

Solicitamos sua permissão para participar de um protocolo de pesquisa. O objetivo desse estudo é avaliar o efeito da alimentação rica em substâncias antioxidantes (presentes naturalmente em alguns alimentos) na chance do estreitamento retornar dentro do stent (molinha de metal).

CONTATOS

Se você tiver qualquer dúvida relacionada a este estudo, poderá entrar em contato com o Dr. Marco V. Wainstein pelo telefone 9916-0826 ou 3316-8342, ou a nutricionista Magda Ambros Cammerer pelo telefone 9806-37-49.

PROCEDIMENTOS

Sua angioplastia será realizada de maneira convencional. Você será avisado quando a pesquisa estiver a ponto de ser iniciada e poderá desistir de participar do estudo neste momento ou em qualquer outro momento sem que isso afete seus cuidados médicos regulares. Se você prosseguir no estudo, o equivalente a **duas colheres de chá de sangue (10 ml)** serão coletados para análise. Não haverá nenhum custo extra para você por participar nesta pesquisa. **Caso tenha concordado em participar do estudo, você deverá retornar em 14 dias para o Ambulatório de Nutrição em Cardiopatia Isquêmica para receber um dieta para ser seguida durante 6 meses. O acompanhamento no ambulatório será através de consultas mensais com a nutricionista responsável pela dieta.**

RISCOS

O único risco da participação nesta pesquisa é a coleta de sangue mas como o próprio cateterismo e angioplastia exigem a punção arterial e venosa não serão necessárias punções adicionais e a quantidade de sangue coletada é mínima.

BENEFÍCIOS

O conhecimento de novas alternativas para melhorar o perfil lipídico e de marcadores inflamatórios pode ser fundamental para o sucesso do seu tratamento.

ALTERNATIVAS

Você não é obrigado a participar deste estudo. Se decidir não participar, sua decisão não vai afetar seu tratamento futuro. Se decidir participar, você poderá desistir a qualquer momento.

CONFIDENCIAL

As informações médicas geradas por esta pesquisa farão parte do seu prontuário hospitalar, exceto em casos especificados no termo de consentimento. As informações que não entrarão para o seu prontuário serão mantidas no arquivo dos pesquisadores e identificadas apenas por um número. As informações contidas no seu prontuário médico não podem ser fornecidas a nenhuma pessoa não afiliada ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os resultados deste estudo poderão ser publicados em uma revista médica ou livro texto médico com finalidade de ensinamento. Entretanto, seu nome não será usado em nenhuma publicação sem a sua permissão prévia. Além disso, se forem realizadas fotografias ou fitas de áudio ou vídeo durante o estudo que possam identificá-lo, você deverá dar permissão adicional para o seu uso após ver o material.

PEDIDO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Você poderá solicitar mais informações a respeito do estudo a qualquer momento. Os números dos telefones dos investigadores estão na primeira página deste consentimento. Nestes telefones os investigadores estarão disponíveis para responder suas perguntas. Você será informado sobre novas descobertas que possam influenciar na continuidade de sua participação na pesquisa.

RECUSA OU ABANDONO DA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A participação neste estudo é totalmente voluntária. Você não precisa participar no estudo. Seus cuidados médicos atuais e futuros não serão afetados caso você não participe da pesquisa. Se você decidir participar, poderá mudar de ideia e retirar-se do estudo a qualquer momento sem afetar seus cuidados médicos neste Hospital. Além disso, o médico responsável pela pesquisa poderá decidir pelo término da sua participação na pesquisa a qualquer momento.

ASSINATURA

Eu confirmo que a proposta desta pesquisa, os procedimentos do estudo e os possíveis riscos e desconfortos bem como potenciais benefícios foram explicados para mim. Todas minhas dúvidas foram respondidas. Eu li este termo de consentimento. A minha assinatura abaixo indica minha concordância em participar do estudo.

Paciente

Data

Testemunha

Data

Assinatura Adicional (se necessário)

Data

Eu expliquei o objetivo deste estudo, os procedimentos do estudo, identificando aqueles considerados como investigacionais, os possíveis riscos e desconfortos bem como os potenciais benefícios e respondi todas dúvidas relacionadas ao estudo da melhor forma possível

Representante do Estudo

Data

7. Anamnese alimentar:

REFEIÇÃO	ALIMENTOS	QUANTIDADE
DESJEJUM Horário:		
COLAÇÃO Horário:		
ALMOÇO Horário:		
LANCHE Horário:		
JANTAR Horário:		
CEIA Horário:		
LANCHES NOS INTERVALOS		

