



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Francilene Gracieli Kunradi Vieira

**CARACTERÍSTICAS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS, REPRODUTIVAS, CLÍNICAS,
NUTRICIONAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO DE MULHERES COM CÂNCER
DE MAMA**

Florianópolis

2008

Francilene Gracieli Kunradi Vieira

**CARACTERÍSTICAS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS, REPRODUTIVAS, CLÍNICAS,
NUTRICIONAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO DE MULHERES COM CÂNCER
DE MAMA**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Nutrição, área de concentração:
Metabolismo e Dietética, da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito final para
a obtenção do título de Mestre em
Nutrição.**

Orientador: Dra. Patrícia Faria Di Pietro

Florianópolis

2008

FRANCILENE GRACIELI KUNRADI VIEIRA

**CARACTERÍSTICAS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS, REPRODUTIVAS, CLÍNICAS,
NUTRICIONAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO DE MULHERES COM CÂNCER
DE MAMA**

**Dissertação aprovada como
requisito final à obtenção do título
de Mestre em Nutrição no Centro de
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Santa Catarina pela
Banca Examinadora:**

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Faria Di Pietro

Profa. Dra. Maria Arlene Fausto

Prof. Dra. Giovanna Medeiros Rataichesk Fiates

Prof. Dra. Maria Alice Altenburg de Assis

Florianópolis, 13 de fevereiro de 2008.

Ao meu esposo, Fabiano, por ter me proporcionado o apoio e a confiança necessários para que eu seguisse adiante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, professora Patrícia Faria Di Pietro, a quem devo muito por todas as oportunidades que tem me proporcionado, como também pelo apoio; muito obrigada;

Ao médico mastologista Carlos Gilberto Crippa e sua equipe da Maternidade Carmela Dutra, por toda a ajuda concedida no decorrer deste trabalho;

Ao professor Edson Luiz da Silva por todos os ensinamentos durante as análises bioquímicas;

Às amigas, Brunna Boaventura, Claudia Ambrosi e Gabriele Rockenbach, pelo apoio e colaboração em todas as etapas;

À professora Maria Arlene Fausto pelo auxílio nas análises estatísticas e por ter aceitado participar da banca de defesa deste trabalho;

Às professoras, Maria Alice Altenburg de Assis e Giovanna Medeiros Rataichesk Fiates, por terem aceitado participar da banca de defesa deste trabalho;

Ao médico patologista, João Péricles da Silva Júnior, do Laboratório de Anatomia Patológica, pela contribuição com os laudos patológicos;

Às nutricionistas da Maternidade Carmela Dutra, Deise Maria Pacheco Gomes, Roseli Eggert Nascimento e Marilene Dilda, pela ajuda durante a coleta de dados;

À técnica de enfermagem, Maria Inês Rosa da Costa, pela sua disposição na coleta sanguínea;

Ao médico Dr Daniel Di Pietro, por toda contribuição e todas as dúvidas solucionadas no decorrer da pesquisa;

A toda equipe de funcionários da Maternidade Carmela Dutra pela colaboração nesse trabalho;

Aos professores do Programa de Pós- Graduação em Nutrição por todos os ensinamentos para a realização de uma boa pesquisa;

Aos meus colegas de mestrado, em especial à Lisiane Scheunemann e Larissa da Cunha Feio, que estiveram comigo desde o início e, com certeza, tornaram tudo mais prazeroso;

Ao secretário da Pós-Graduação, Nelson Delfino, que me ajudou em muitos momentos da maneira mais paciente e alegre possível;

Ao meu esposo, Fabiano, pelo amor dedicado, por acreditar no meu potencial, pelo ombro amigo e pela compreensão nos momentos difíceis;

Aos meus pais, José e Luzia, pela paciência, oportunidade e disposição em financiar meus estudos por um longo período;

À minha família, pelo carinho, dedicação e estímulo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida;

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo descrever as características sócio-demográficas, reprodutivas, clínicas e nutricionais, bem como verificar se há associação entre determinadas características e o estresse oxidativo de mulheres com câncer de mama, atendidas na Maternidade Carmela Dutra, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Todos os dados foram coletados a partir de um inquérito padronizado e de um questionário de frequência alimentar validado. O estresse oxidativo foi avaliado através da determinação das concentrações plasmáticas das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, hidroperóxidos lipídicos e proteínas carboniladas, capacidade antioxidante total sérica e glutatona reduzida eritrocitária. A associação entre o estresse oxidativo e as variáveis investigadas foi avaliada usando um modelo de regressão logística. Quarenta mulheres entre 30 e 60 anos, idade média de $48 \pm 7,43$ anos foram selecionadas para o estudo. Entre os fatores que apresentam forte associação com o câncer de mama, foram encontradas prevalências de 40% para menarca até os 12 anos, 87,5% para uso prolongado de contraceptivos orais, 27,5% para terapia de reposição hormonal e 35% para antecedente familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau. Para outros fatores investigados, as prevalências foram mais elevadas em história de abortos (38%), tabagismo (50%), sedentarismo (75%), peso excessivo (70%), elevado consumo de óleos e gorduras (90%) e de carnes e ovos (85%) e baixo consumo de verduras e legumes (92,5%) e de frutas (47,5%). O modelo de regressão logística final para concentração plasmática de hidroperóxidos lipídicos demonstrou que a presença de linfonodos axilares comprometidos (odds ratio [OR]=0,07; intervalo de confiança 95% [IC_{95%}]=0,00-0,62), consumo de laticínios pobres em gordura (OR=0,94; IC_{95%}=0,90-0,99) e de frutas ricas em vitamina C (OR=0,49; IC_{95%}=0,24-0,99) foram associados com concentração plasmática diminuída de hidroperóxidos lipídicos e o consumo de óleos vegetais (OR=2,98; IC_{95%}=1,12-7,93) foi associado com um maior risco de concentração plasmática aumentada de hidroperóxidos lipídicos. O consumo de carnes processadas (OR=2,20; IC_{95%}=1,03-4,68) e gorduras de origem animal (OR=12,72; IC_{95%}=1,09-147,82) foram fatores associados com capacidade antioxidante total sérica diminuída enquanto que o consumo de leites e derivados (OR=0,46; IC_{95%}=0,25-0,84) e verduras crucíferas (OR 0,57; IC_{95%}=0,35-0,92) foram fatores protetores contra capacidade antioxidante total sérica diminuída. Na análise

multivariada, a renda familiar acima de dois salários mínimos (OR=18,0; IC_{95%}=1,63-198,5) foi associada com concentração eritrocitária aumentada de glutathione reduzida. Nenhuma associação foi encontrada, no modelo de regressão logística, entre as variáveis examinadas e as concentrações plasmáticas das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico e proteínas carboniladas. Conhecer a prevalência das variáveis associadas ao câncer de mama pode ser de grande importância para a saúde pública no que diz respeito à adoção de programas de intervenção para o controle do câncer de mama. Os resultados da associação entre estresse oxidativo e os fatores investigados podem contribuir para uma melhor compreensão do papel que essas variáveis exercem sobre o estresse oxidativo.

Palavras-chave: câncer de mama, fatores de risco, estresse oxidativo, consumo alimentar

ABSTRACT

The objective of this work was to describe the nutritional, clinical, reproductive and demographic-social characteristics and also to investigate the association between these variables and oxidative stress levels of women with breast cancer from Carmela Dutra Maternity, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. All the data were collected with a standardized protocol and a validated food frequency questionnaire. The extent of oxidative stress blood levels evidenced by plasma thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), plasma lipid hydroperoxides (LOOH), plasma protein carbonyl, serum total antioxidant capacity (TAC) and erythrocyte reduced glutathione (GSH) was estimated. Association between oxidative stress levels and investigated factors was analyzed using a logistic regression model. A total of 40 women aged 30-60 years were included in the study. Among the factors associated with breast cancer, 40% had menarche before 12 years old, 87.5% had a prolonged use of oral contraceptives, 27.5% were on hormonal replacement therapy e 35% had a first-degree family history of breast cancer. The prevalence of other factors was higher in women with a history of abortion (38%), smoking (50%), low physical activity (75%), overweight (70%), high oils and fats intake (90%), high meat and eggs intake (85%), low vegetables intake (92.5%) and low fruits intake (47.5%). The logistic regression final model for plasma levels of LOOH show that the positive axillary lymph node status (odds ratio [OR]=0.07; 95% confidence interval [CI_{95%}]=0.00-0.62), daily intake of low-fat dairy (OR=0.94; CI_{95%}=0.90-0.99) and high vitamin C fruits (OR=0.49; CI_{95%}=0.24-0.99) were associated with decreased plasma levels of LOOH and oils intake (OR=2.98; CI_{95%}=1.12-7.93) was associated with a higher risk of increased plasma levels of LOOH. Daily intake of processed meats (OR=2.20; CI_{95%}=1.03-4.68) and animal fat (OR=12.72; CI_{95%}=1.09-147.82) were factors associated with decreased serum levels of TAC and daily intake of dairy products (OR=0.46; CI_{95%}=0.25-0.84) and cruciferous vegetables (OR=0.57; CI_{95%}=0.35-0.92) were the protective factor against decreased serum levels of TAC. In multivariate analyses, family income above two minimum wage (OR=18.0, CI_{95%}=1.63-198.5) was associated with increased levels of erythrocyte GSH. Plasma levels of TBARS and protein carbonyl were not associated with variables examined in univariate logistic regression. To know the prevalence of variables associated with breast cancer can be very important to public health in adoption of

intervention programs for control of this neoplasm. The data obtained from the association between oxidative stress levels and the factors investigated would permit a better understanding of the role that these variables play in the oxidative stress.

Key words: breast cancer, risk factors, oxidative stress, dietary intake

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Modificado de HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999)	30
Quadro 2 - Principais antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Modificado de VANNUCCHI et al.,1998)	33
Quadro 3 - Pontos de corte do índice de massa corporal (WHO, 2000)	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGP	Ácido Graxo Poliinsaturado
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BHT	Butil Hidroxitolueno
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
CEPSH	Comitê de Ética para Pesquisas com Seres Humanos
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxiribonucléico)
DNPH	2,4 Dinitrofenilhidrazina
DTNB	Ácido 5,5 Ditio-2-Nitrobenzóico
EDTA	Ácido etileno diaminoacético
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FeCl ₃	Cloreto férrico
FOX	Fe ⁺³ xyleneol orange
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Potential</i> (Potencial Antioxidante Pela Redução do Ferro)
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
GST	Glutathione S-Transferase
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HNO ₂	Ácido Nitroso
HOCL	Ácido Hipocloroso
HOO [·]	Radical Hidroperoxil
IMC	Índice de Massa Corporal
INCA	Instituto Nacional de Câncer
L [·]	Radical Lipídico

LPO	Lipoperoxidação
M	Molar
MDA	Malondialdeído
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mn	Manganês
N	Normal
N ₂ O ₃	Trióxido Dinitrogênio
N ₂ O ₄	Tetróxido Dinitrogênio
nm	Nanômetros
NO ⁻	Ânion Nitrosil
NO ⁺	Cátion Nitrosil
NO ⁺ ₂	Cátion Nitrônio
NO [·]	Óxido Nítrico
NOO [·]	Dióxido de Nitrogênio
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
O ₂ ^{·-}	Radical Superóxido
OH [·]	Radical Hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ONOOH	Ácido Peroxinitroso
NOS	Óxido Nítrico Sintase
¹ Δg	Oxigênio singlet
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PPGN	Programa de Pós-Graduação em Nutrição
QFA	Questionário de Frequência Alimentar
RL	Radical Livre
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucléico)
RO [·]	Radical Alcoxil
ROO [·]	Radical Peroxil
ROONO	Alquil Peroxinitrito
SOD	Superóxido Dismutase

TBA	<i>Thiobarbituric Acid</i> (Ácido Tiobarbitúrico)
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i> (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)
TCA	<i>Trichloroacetic Acid</i> (Ácido Tricloroacético)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMP	1,1,3,3-Tetramethoxypropano
TPP	Trifenilfosfina
TNB	Ânion Tiolato
TNM	Tumor-Nodo-Metástase
TPTZ	2,4,6-Tri (2-pyridil)-s-triazina
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
μL	Microlitros

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Fisiopatologia do câncer de mama	22
2.2 Epidemiologia do câncer de mama	24
2.2.1 Incidência e mortalidade	24
2.2.2 Fatores de risco	25
2.3 Radicais livres, antioxidantes e estresse oxidativo	29
2.3.1 Radicais livres	29
2.3.2 Antioxidantes	32
2.3.3 Estresse oxidativo	36
2.4 Câncer de mama, estresse oxidativo e alimentação	38
2.5 Referências Bibliográficas	49
CAPÍTULO 3 - MÉTODOS	58
3.1 Local do estudo	59
3.2 Critérios e procedimentos para seleção dos sujeitos	59
3.4.1 Critérios de inclusão	59
3.4.2 Critérios de exclusão	59
3.3 População do estudo	60
3.4 Critérios éticos da pesquisa	60
3.5 Instrumentos e técnicas de coletas de dados	60
3.5.1 Questionário sócio-demográfico, reprodutivo, clínico e antropométrico	60
3.5.2 Questionário de Frequência Alimentar	61
3.5.3 Análise do consumo alimentar habitual	62
3.5.4 Avaliação Bioquímica	64
3.6 Tratamento e análise dos dados	69
3.7 Referências Bibliográficas	70
CAPÍTULO 4 - PERFIL SÓCIO-DEMOGRÁFICO, REPRODUTIVO, CLÍNICO E NUTRICIONAL DE MULHERES COM CÂNCER DE MAMA	72
CAPÍTULO 5 - FACTORS ASSOCIATED WITH OXIDATIVE STRESS IN BREAST CANCER WOMEN	87

CAPÍTULO 6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
APÊNDICES	112
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	113
APÊNDICE B - Questionário sócio-econômico, clínico e antropométrico	114
APÊNDICE C - Questionário de frequência alimentar	116
APÊNDICE D - Alimentos de cada grupo e subgrupo alimentar	119
ANEXOS	120
ANEXO A - Normas de publicação da revista Femina	121
ANEXO B - Tabela de safra de alimentos	122
ANEXO C - Normas de publicação da revista Archivos Latinoamericanos de Nutrición	123
ANEXO D - Normas de publicação da revista Nutrition	127

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama constitui um importante problema de Saúde Pública devido à sua elevada incidência e mortalidade. No Brasil, é o segundo tipo de câncer mais incidente e o mais frequente entre as mulheres, com um risco estimado para 2008, de 51 casos novos a cada 100 mil mulheres. Para o estado de Santa Catarina e para a capital Florianópolis, o risco estimado de casos novos em 2008 é superior às estimativas do país, sendo de 52 e 62 casos a cada 100 mil mulheres, respectivamente (BRASIL, 2007).

O câncer de mama é uma doença considerada multifatorial de causas endógenas e ambientais, em que a susceptibilidade genética do indivíduo interage com fatores sócio-demográficos, reprodutivos, nutricionais e outros fatores de risco relacionados ao estilo de vida (NKONDJOCK; GHADIRIAN, 2005). A neoplasia maligna da mama pode ser definida como uma doença caracterizada pela multiplicação e propagação descontrolada e anormal de células do tecido mamário, constituindo o resultado de um acúmulo progressivo de mutações no material genético (WAITZBERG; BRENTANI, 2004). Segundo Halliwell (1996), estudos experimentais têm demonstrado que espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são fortemente capazes de alterar o material genético das células. As ERO e ERN constituem substâncias altamente reativas e instáveis que são produzidas no organismo, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, e quando estão em excesso procuram estabilidade reagindo com constituintes celulares como proteínas, lipídeos, carboidratos e nucleotídeos, resultando no dano celular oxidativo ou estresse oxidativo (HALLIWELL, 1996).

O estresse oxidativo é um processo caracterizado pelo desequilíbrio entre a formação das ERO e ERN e a neutralização destas substâncias pelos antioxidantes (GRIMBLE, 1994). Diversos estudos têm demonstrado a associação do estresse oxidativo no desenvolvimento do câncer de mama (CHAJES et al., 1999; HUANG et al., 1999; KHANZODE et al., 2004; KUMAR et al., 1991; KUMARAGURUPARAN et al., 2002; POLAT et al., 2002; RAY et al., 2000; SENER et al., 2006; YEH et al., 2005).

Em relação ao papel da alimentação no desenvolvimento do câncer de mama, vários estudos epidemiológicos têm sido realizados com o intuito de esclarecer as evidências sobre os possíveis fatores dietéticos associados ao câncer de mama (ADZERSEN et al., 2003; CHING et al., 2002; CLARKE et al., 1999; DE STEFANI et al.,

1997; NKONDJOCK et al., 2003; SHANNON et al., 2003). As principais hipóteses sobre os efeitos da dieta no aumento do risco de câncer de mama são a obesidade, alta ingestão de carne vermelha, álcool e gordura, enquanto que o aumento da ingestão de fibras, frutas, verduras e alimentos fontes de antioxidantes podem reduzir o risco de câncer de mama (KEY et al., 2003). Quanto ao efeito protetor da alimentação contra o desenvolvimento do câncer de mama, tem sido evidenciado que as frutas e verduras podem reduzir os níveis do estresse oxidativo devido à capacidade das vitaminas, minerais, polifenóis e outros constituintes presentes nestes alimentos atuarem como antioxidantes e inativarem as ERO e ERN, responsáveis pela alteração do material genético (GESTER, 1993; TERRY et al., 2002; WITTE et al., 1997). Em contrapartida, dietas ricas em gordura têm sido indicadas por promover o desenvolvimento da carcinogênese mamária, em função deste constituinte da dieta atuar como um agente carcinogênico, favorecer o acúmulo de ERO e ERN e assim, induzir o estresse oxidativo (GREENWALD et al., 1997; WILLETT, 1998). Os resultados dos estudos, no entanto, são controversos, não se tendo, ainda, clara evidência da atuação da dieta no processo de carcinogênese mamária.

Apesar das evidências a respeito do efeito da alimentação no desenvolvimento do câncer de mama e do estresse oxidativo, caracterizando o processo de carcinogênese mamária, na literatura são raros os estudos encontrados que procuram investigar a existência de associação entre alimentação e estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama.

A partir do exposto acima, a realização do presente estudo se justificou em virtude de quatro motivos principais. Primeiramente, a elevada incidência e mortalidade por câncer de mama em Florianópolis, em Santa Catarina, no Brasil e no mundo. As evidências acerca do efeito da alimentação no desenvolvimento do câncer de mama e o papel do estresse oxidativo, caracterizando o processo de carcinogênese mamária, constituem outros dois fortes motivos para o desenvolvimento da pesquisa, em função principalmente dos poucos estudos existentes no Brasil que procuram verificar estas evidências. E, por fim, a escassez no mundo e a inexistência, no Brasil, de estudos que verifiquem a associação entre o consumo alimentar e o estresse oxidativo em casos de câncer de mama.

Este estudo teve como objetivo descrever as características sócio-demográficas, reprodutivas, clínicas e nutricionais, bem como verificar se existe associação entre determinadas características e o estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama.

1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADZERSEN, K. H.; JESS, P.; FREIVOGEL, K. W.; GERHARD, I.; BASTERT, G. Raw and cooked vegetables, fruits, selected micronutrients, and breast cancer risk: a case-control study in Germany. **Nutrition and Cancer**, v. 46, p. 131-137, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativas 2008: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

CHAJES, V.; LHUILLERY, C.; SATTLER, W.; KOSTNER, G. M.; BOUGNOUX, P. Alpha-tocopherol and hydroperoxide content in breast adipose tissue from patients with breast tumors. **International Journal of Cancer**, v. 67, p. 170-175, 1996.

CHING, S.; INGRAN, D.; HAHNEL, R.; BEILBY, J.; ROSSI, E. Serum levels of micronutrients, antioxidants and total antioxidants status predict risk of breast cancer in case control study. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 303-305, 2002.

CLARKE, L. H.; CLARKE, R.; LIPPMAN, M. The influence of maternal diet on breast cancer risk among female offspring. **Nutrition**, v. 15, p. 392-401, 1999.

DE STEFANI, E.; RONCO, A.; MENDILAHARSU, M.; GUIDOBONO, M.; DENEEO, P. H. Meat intake, heterocyclic amines, and risk of breast cancer: a case-control study in Uruguay. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 6, p. 573-581, 1997.

GESTER, H. Anticarcinogenic effects of common carotenoids. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 63, p. 93-121, 1993.

GREENWALD, P.; SHERWOOD, K.; MCDONALD, S. Fat, caloric intake, and obesity: lifestyle risk factors for breast cancer. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 97, p. S24-S30, 1997.

GRIMBLE, R. F. Nutritional antioxidants and the modulation of inflammation: theory and practice. **New Horizons**, v. 2, p. 175-185, 1994.

HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Research**, v. 25, p. 57-74, 1996.

HUANG, Y. L.; SHEU, J. Y.; LIN, T. H. Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 32, p. 131-136, 1999.

KEY, T. J.; ALLEN, N. E.; SPENCER, E. A.; TRAVIS, R. C. Nutrition and breast cancer. **The Breast**, v. 12, p. 412-416, 2003.

KHANZODE, S. S.; MUDDESHAWAR, M. G.; KHANZODE, S. D.; DAKHALE, G. N. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different stages of breast cancer. **Free Radical Research**, v. 38, p. 81-85, 2004.

KUMAR, K.; THANGARAJU, M.; SACHDANANDAM, P. Changes observed in antioxidant system in the blood of postmenopausal women with breast cancer. **Biochemistry International**, v. 25, p. 371-380, 1991.

KUMARAGURUPARAN, R.; SUBAPRIYA, R.; KABALIMOORTHY, J.; NAGINI, S. Antioxidant profile in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 275-279, 2002.

NKONDJOCK A, GHADIRIAN P. Risk factors and risk reduction of breast cancer. **Medical Science**, v. 21, p.175-180, 2005.

NKONDJOCK, A.; SHATENSTEIN, B.; GHADIRIAN, P. A case-control study of breast cancer and dietary intake of individual fatty acids and antioxidants in Montreal, Canada. **The Breast**, v. 12, p. 131-138, 2003.

POLAT, M. F.; TAYSI, S.; GUL, M.; CIKMAN, O.; YILMAZ, I.; BAKAN, E.; et al. Oxidant/antioxidant status in blood of patients with malignant breast tumour and benign breast disease. **Cell Biochemistry and Function**, v. 20, p. 327-331, 2002.

RAY, G.; BATRA, S.; SHUKLA, N. K.; DEO, S.; RAINA, V.; ASHOK, S.; et al. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 59, p. 163-170, 2000.

SENER, E. D.; GONENC, A.; AKINCI, M.; TORUN, M. Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. **Cell Biochemistry and Function**, v. 25, p. 377-82, 2007.

SHANNON, J.; COOK, L. S.; STANFORD, J. L. Dietary intake and risk of postmenopausal breast cancer (United States). **Cancer Causes and Control**, v. 14, p. 19-27, 2003.

TERRY, P.; JAIN, M.; MILLER, A. B.; HOWE, G. R.; ROHAN, T. E. Dietary carotenoids and risk of breast cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 883-888, 2002.

WAITZBERG, A. F. L.; BRENTANI, M. M. Nutrição e câncer de mama. In: WAITZBERG, D. L. **Dieta, Nutrição e Câncer**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004.

WILLETT, W. C. Dietary fat intake and cancer risk: a controversial and instructive story. **Cancer Biology**, v. 8, p. 245-253, 1998.

WITTE, J. S.; URSIN, G.; SIEMIATYCKI, J.; THOMPSON, W. D.; HILL, A. P.; HAILE, R. W. Diet and premenopausal bilateral breast cancer: a case-control study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 42, p. 243-251, 1997.

YEH, C. C.; HOU, M. F.; TSAI, S. M.; LIN, S. K.; HSIAO, J. K.; HUANG, J. C.; WU, S. H.; HOU, L. A.; MA, H.; TSAI, L. Y. Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 361, p. 104-111, 2005.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama pode ser definido como uma doença caracterizada pela multiplicação e propagação descontrolada e anormal de células do tecido mamário (WAITZBERG; BRENTANI, 2004). O processo de conversão de uma célula normal a um estado anormal (maligno) constitui um processo lento, resultante de um acúmulo progressivo de mutações no ácido desoxiribonucléico (DNA) de uma célula, denominado carcinogênese (LOFT; POULSEN, 1996; RANG et al., 2004). O processo de carcinogênese pode, classicamente, ser dividido em três etapas: iniciação, promoção e progressão (WAITZBERG; BRENTANI, 2004).

A iniciação constitui a etapa caracterizada pela alteração no DNA (mutação) da célula. Estas mutações podem ser herdadas ou adquiridas e são responsáveis por alterar genes-chave, necessários para a manutenção da homeostasia celular, fazendo com que ocorra perda da função celular, tais como perda do controle de divisão celular, apoptose e diferenciação celular (BELTRÃO-BRAGA et al., 2004). Há duas categorias principais de alterações genéticas que levam ao câncer: ativação de proto-oncogenes em oncogenes e inativação dos genes supressores de tumorais. Os proto-oncogenes são genes celulares normais que participam do controle das funções vitais, como proliferação, diferenciação, migração e morte celular programada (apoptose). Quando esses genes sofrem mutação, diz-se que estão *ativados* e passam a receber o nome de oncogenes, não realizando mais suas funções celulares. Os genes supressores tumorais codificam proteínas que têm a capacidade de suprimir alterações malignas, impedindo o acúmulo de mutações no DNA da célula. Quando ocorre lesão no DNA de uma célula, por exemplo, os níveis das proteínas codificadas pelos genes supressores tumorais aumentam no interior da célula, as quais atuam promovendo o reparo da lesão ocorrida. A mutação em genes supressores tumorais, que os torna *inativos*, constitui um ponto crítico do processo de carcinogênese, por ocasionar um aumento do número de lesões no DNA da célula (RANG et al., 2004).

De acordo com Baracat e Oliveira (1995), um número substancial de evidências obtidas através de estudos experimentais e de extensiva análise genética em tumores de mama humanos, sugerem que uma variedade de alterações genéticas adquiridas contribui para a etiologia do câncer de mama. Entre as alterações genéticas associadas ao câncer de

mama estão incluídas o aumento da expressão dos oncogenes erbB-2, int-2 e myc e inativação dos genes supressores tumorais BRCA1, BRCA2, p53, Rb1 (DIEZ et al., 2006; KENEMANS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005).

As mutações adquiridas podem ser causadas por erros durante o processo de replicação ou por mutagênicos endógenos, como as ERO e ERN, ou ainda serem induzidas por agentes externos. Os agentes externos, por sua vez, podem ser divididos em três classes: 1) agentes físicos, como luz ultravioleta e radiações ionizantes; 2) agentes biológicos, como alguns vírus que se integram ao genoma celular interrompendo seqüências gênicas; e 3) agentes químicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e as nitrosaminas (BELTRÃO-BRAGA et al., 2004; KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004).

Na segunda etapa da carcinogênese, a promoção, as células geneticamente alteradas, ou seja, iniciadas, sofrem a ação de agentes promotores (carcinogênicos) que promovem a multiplicação da população celular que carrega a mutação inicial. Os agentes carcinogênicos atuam por diversos mecanismos, dentre os quais dois são os principais: 1) promovem a proliferação celular desregulada, por causar um dano tecidual persistente associado à criação de microambiente pró-inflamatório que estimule a proliferação celular; e 2) induzem o estresse oxidativo que leva ao acúmulo de ERO e ERN com potencial de causar mutações (ATHAR, 2002; CHIAGURI, 2003; TROLL et al., 1983).

A progressão é a etapa que se manifesta pelo acúmulo de mutações que ocorrem em função dos mecanismos hormonais intracelulares não serem mais capazes de eliminar a célula tumoral que acaba por aumentar a frequência de mutações. Nesta etapa, o câncer já está instalado e evolui até o surgimento das primeiras manifestações clínicas, como a metástase (manifestação da doença em órgãos à distância do local inicial) (CLEMENTS, 1991).

Após a confirmação do diagnóstico do câncer de mama, deve ser determinado o estágio clínico ou extensão anatômica da doença, também denominado estadiamento. O estágio do câncer de mama é baseado na classificação dos tumores malignos, TNM, proposta pela União Internacional contra o Câncer (UICC), que tem por base a avaliação de três componentes: (T) a extensão do tumor, (N) a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais e (M) a ausência ou presença de metástase à distância (BRASIL, 2004).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

2.2.1 Incidência e mortalidade

O câncer de mama constitui um importante problema de Saúde Pública devido a sua elevada incidência e mortalidade. Parkin e colaboradores (2001) estimaram, para o ano de 2000, Um milhão de casos novos de câncer de mama em todo o mundo, sendo o mais freqüente entre o sexo feminino e representando 22% de todos os tipos de câncer.

No Brasil, excluindo-se os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama consistiu o tipo de câncer mais incidente em nosso país e também o mais freqüente entre as mulheres. De acordo com estimativas realizadas pelo Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer (INCA), o número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2008 é de 49400, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres. Tanto em nível mundial, quanto em nível nacional, a estimativa de incidência do câncer de mama é variável nas diversas regiões. Para 2008, o risco estimado é de 68/100 mil na região sudeste, 67/100 mil na região sul, 38/100 mil na região centro-oeste, 28/100 mil na região nordeste e 16/100 mil na região norte (BRASIL, 2007).

Para o estado de Santa Catarina, são esperados 1610 casos novos de câncer de mama, sendo que a taxa bruta de incidência para esta neoplasia, em mulheres catarinenses, é ligeiramente superior à estimativa média do país, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Em Florianópolis, inclusive, a situação é ainda mais agravante. Em 2008, são esperados 130 casos novos de câncer de mama, na capital do estado catarinense, com um risco estimado de 62 casos a cada 100 mil mulheres. Apesar de ser considerado um câncer de relativo bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente por que a doença ainda seja diagnosticada em estádios avançados (BRASIL, 2007).

O câncer de mama constitui a primeira causa de morte por câncer em mulheres no país. No Brasil e em Santa Catarina, no período entre 1979 a 1983, 13,73% e 13,50%, respectivamente, das mortes por câncer em mulheres, deveu-se ao câncer de mama. Já, no período entre 1995 a 1999, estes percentuais aumentaram para 15,5% e 14,18%, respectivamente (BRASIL, 2002). Em 2004, no Brasil, foram registrados 11 óbitos por câncer de mama a cada 100 mil mulheres, e, em Santa Catarina, este registro foi de 10/100mil mulheres. Neste mesmo ano, em Florianópolis, o número de óbitos foi superior

ao registrado no país e no estado, sendo que 16 a cada 100 mil mulheres morreram em função do câncer de mama (BRASIL, 2007).

Observando-se que as estimativas de incidência e os registros de mortalidade por câncer de mama são variados nas diferentes regiões do país e do mundo, deve-se considerar e associar variáveis relacionadas ao estilo de vida e outras condições ambientais, entre as populações, como fatores de risco para o desenvolvimento da doença (BARACAT; OLIVEIRA, 1995).

2.2.2 Fatores de risco

Estudos epidemiológicos, retrospectivos e prospectivos, e estudos experimentais têm sugerido uma série de variáveis que podem aumentar ou diminuir o risco de desenvolver o câncer de mama (ATALAH, et al., 2000; CONTRERAS et al., 1999; DIETZ et al., 1997; FRASER; SHAVLIK, 1997; TESSARO et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2001). Tais pesquisas são cruciais para o conhecimento da fisiologia da doença e identificação de fatores de risco que podem ser modificados ou controlados na tentativa de diminuir o número de casos novos ou óbitos por esta neoplasia (MAHON, 1998).

Entre os principais fatores de risco considerados pelos estudos epidemiológicos e experimentais, destaca-se a idade avançada, história familiar, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, idade avançada da primeira gestação, aborto, não amamentação, exposição a hormônios esteróides sexuais, exposição à radiação ionizante, características sócio-demográficas, tais como elevado nível sócio-econômico, estado civil solteira e raça branca, e características relacionadas ao estilo de vida, tais como fumo, consumo de álcool, alimentação rica em gordura e obesidade (AMORIM et al., 2002; BARROS et al., 1996; HARDY et al., 1989; KALACHE et al., 1993; LAMAS; PEREIRA, 1999; LIMA et al., 2001; PAIVA et al., 2002; SOUZA et al., 1998; TESSARO et al., 2001; TESSARO et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2001). Outros fatores associados ao desenvolvimento do câncer de mama constituem a densidade mamária elevada, história prévia de doença mamária benigna, ou de câncer de ovário e/ou de endométrio, ou ainda história prévia de câncer na mama contralateral (THULER, 2003).

A idade constitui o fator de risco mais importante e mais conhecido para a gênese do câncer de mama, sendo que há um aumento da incidência e mortalidade por esta neoplasia com o aumento da idade. No Brasil, para o período compreendido entre 1996 e

2000, dados de incidência dos Registros de Câncer de Base Populacional indicam que 60 a 70% dos casos novos ocorreram na faixa etária compreendida entre os 40 e 60 anos de idade (BRASIL, 2003). Em relação à mortalidade por câncer de mama, os dados disponíveis para o período de 1979 a 1999 mostraram que 91% das mortes foram registradas em mulheres com mais de 40 anos (BRASIL, 2002).

A história familiar constitui um importante fator de risco para o câncer de mama, especialmente se um ou mais parentes de primeiro grau (mãe ou irmã) foram acometidas antes dos 50 anos de idade (THULER, 2003). Apesar da sua importância, de acordo com a Associação Americana de Câncer, a maioria das mulheres com câncer de mama, (aproximadamente 80%) não tem história familiar da doença e somente cerca de 5 a 10% dos casos podem ser atribuídos à herança genética (MEISTER; MORGAN, 2000).

A menarca precoce (antes 12 anos), menopausa tardia (acima 55 anos), nuliparidade, uso de contraceptivos hormonais orais e terapia de reposição hormonal proporcionam maior exposição do epitélio mamário aos hormônios esteróides sexuais que, sabidamente desempenham importante papel na etiologia do câncer de mama, por aumentar a probabilidade de ocorrer a mutação que precede o câncer em função de estimularem a proliferação de células do tecido mamário (GOMES et al., 2001; OLIVEIRA; ALDRIGHI, 2003; TESSARO et al., 2001).

As evidências epidemiológicas apontam que o grande intervalo entre a menarca e a primeira gestação, pode favorecer a ação de fatores que aumentam o risco de câncer de mama (HARDY et al., 1989). Os estudos têm demonstrado que mulheres, cuja primeira gestação ocorre aos 35 anos apresentam um risco quatro vezes maior de adoecer por câncer de mama, quando comparadas com mulheres que tiveram filhos aos vinte anos de idade (KELSEY, 1993; MACMAHON et al., 1982; RAO et al., 1994). Segundo Barcat e Oliveira (1995), a menor incidência de câncer de mama em mulheres, cuja primeira gestação ocorre aos vinte anos está associada às alterações mamárias decorrentes das modificações hormonais na segunda metade da gestação.

A alta prevalência de história de aborto também tem sido apontada como fator de risco para o câncer de mama (REIS et al., 1995). Segundo Kitchen e colaboradores (2005), a interrupção da gravidez quando o tecido mamário está submetido a altas concentrações de estrógenos pode favorecer a proliferação de células malignas.

Estudos epidemiológicos indicam que mulheres que amamentam seus filhos apresentam menor risco de desenvolver o câncer de mama do que mulheres que não

amamentam (CONTRERAS et al., 1999; PAIVA et al., 2002). Durante a lactação ocorrem modificações que podem proteger a mulher do câncer de mama, tais como liberação de células transformadas pela produção láctea que inibem o crescimento de células cancerosas (MILLER; BULBROOK, 1986).

A exposição à radiação ionizante pode causar câncer em qualquer órgão, por estimular a produção de ERO altamente tóxicas, com potencial de promover a mutação genética. Dentre as neoplasias mais freqüentemente observadas pós-radiação estão as de mama, tireóide e leucemia (TOMATIS et al., 1990).

Ao contrário do câncer de colo de útero, o câncer de mama está associado ao processo de industrialização, com risco de adoecimento relacionado ao elevado nível sócio econômico (GOMES et al., 1995; GOMES et al., 2001; GUERRA et al., 2005). Mulheres moradoras de regiões e localidades industrializadas e/ou com nível sócio-econômico elevado, habitualmente apresentam estilos de vida associados ao aumento do risco de câncer de mama, tais como nuliparidade, não amamentação, dieta rica em gordura, fumo e consumo de álcool (BARACAT; OLIVEIRA, 1995; THULER, 2003).

A raça branca e a condição civil solteira também têm sido considerados fatores de risco para o câncer de mama em estudos epidemiológicos (HARDY et al., 1989; LAING et al., 1993; LIMA et al., 2001; TESSARO et al., 2001). Nos Estados Unidos, embora a incidência de câncer de mama seja sensivelmente maior entre mulheres da raça branca do que entre mulheres da raça negra, a mortalidade por esta neoplasia é maior em mulheres negras (ADEMUYIWA; OLOPADE, 2003). O elevado índice de mortalidade por câncer de mama em mulheres negras é provavelmente devido ao diagnóstico tardio, em consequência da dificuldade de acesso ao tratamento médico e aos programas de detecção (WOODS et al., 2006). O estado civil solteiro tem sido apontado como fator de risco para o câncer de mama em função da sua associação a outras variáveis de risco para a doença, tais como, nuliparidade, história de aborto e não amamentação (BARACAT; OLIVEIRA, 1995).

Em diversos estudos epidemiológicos, o fumo tem sido fortemente associado a um aumentado risco para o câncer de mama (AL-DELAIMY et al., 2004; HANAOKA et al., 2005; MANJER et al., 2004; NAGATA et al., 2006). Estudos experimentais indicam que o cigarro contém substâncias que são potencialmente carcinogênicas ao tecido mamário, tais como compostos N-nitrosos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (EL-BAYOUMY, 1992; HOFFMANN et al., 2001). Além disso, a alta prevalência de mutações no gene p53

encontrada no tecido mamário de mulheres fumantes comparada a de não fumantes, potencializa as evidências de uma positiva associação entre fumo e risco de câncer de mama (LI et al., 1999; CONWAY et al., 2002).

O consumo de álcool constitui um reconhecido fator de risco para o câncer de mama (ATALAH et al., 2000; SINGLETARY, 1997; SMITH-WARNER et al., 1998; SWANSON et al., 1997). Em alguns estudos, a associação entre câncer de mama e consumo de álcool foi dependente da quantidade consumida diariamente (KEY et al., 2003; SMITH-WARNER et al., 1998; VAN DEN BRANDT et al., 1995). Apesar do consumo de álcool ser reconhecido como fator de risco para o câncer de mama, seu mecanismo de ação no desenvolvimento da carcinogênese mamária ainda não está bem estabelecido. Wright e colaboradores (1999) propõem que durante o metabolismo do álcool, a ação combinada das enzimas álcool desidrogenase e xantina oxidoreductase presentes no tecido mamário, promove a produção de ERO, as quais induzem o dano oxidativo ao DNA, contribuindo para o desenvolvimento da carcinogênese mamária. Outro possível efeito do álcool no desenvolvimento do câncer de mama é sua ação no aumento da concentração endógena de hormônios esteroidais, conferindo maior exposição do tecido mamário a estes hormônios, responsáveis por estimular a proliferação celular e as chances de ocorrer alteração do material genético que precede o câncer (DORGAN et al., 2001; KEY et al., 2003).

Dentre os fatores relacionados à nutrição, o índice de massa corporal (IMC) elevado e alguns constituintes da alimentação estão cada vez mais associados ao risco de câncer de mama. Key e colaboradores (2003), em uma revisão sobre alimentação, IMC e câncer de mama, concluíram que a associação do IMC com o câncer de mama difere a partir do estado da menopausa. Em mulheres pré-menopausa, a associação entre câncer de mama e IMC elevado é fraca ou inexistente, enquanto que em mulheres pós-menopausa o risco de câncer de mama tem sido evidentemente aumentado com o aumento do IMC (DIETZ et al., 1997; HALL et al., 2000; URSIN et al., 1995; VASCONCELOS et al., 2001). Van Den Brandt e colaboradores (2000) observaram que o risco de desenvolvimento de câncer de mama foi 30% maior em mulheres pós-menopausa com IMC acima de 31kg/m^2 , quando comparadas com mulheres com IMC médio de 20kg/m^2 .

Em relação à alimentação, atualmente há uma preocupação cada vez maior em esclarecer as evidências de que alguns constituintes da dieta possam ser considerados fatores de risco ou de proteção, assim como, os mecanismos pelos quais estes exercem seus

efeitos no desenvolvimento do câncer de mama. Estes constituintes da dieta serão discutidos mais adiante.

2.3 RADICAIS LIVRES, ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO

2.3.1 Radicais livres

Um radical livre (RL) é qualquer espécie de existência independente que contém um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita externa (HALLIWELL, 1996a). Espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) constituem substâncias reativas e instáveis, geradas *in vivo*, tanto em condições fisiológicas normais quanto em condições patológicas. ERO e ERN são termos coletivos que incluem ambos radicais de oxigênio e nitrogênio, respectivamente, e algumas espécies não radicalares que são agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidas em radicais (FANG et al., 2002; HALLIWELL, 1996b). Desta forma, os termos ERO e ERN parecem mais corretos, uma vez que alguns agentes reativos não apresentam elétrons livres em sua última camada eletrônica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999) (Quadro 1).

As ERO e as ERN são formadas a partir do oxigênio molecular (O_2) por reações enzimáticas e não enzimáticas (FANG et al., 2002). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). Durante este processo são formados os intermediários reativos, como os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxil (HOO^{\cdot}), hidroxil (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FRIDOVICH, 1999). Durante a respiração, cerca de 95-99% do O_2 é reduzido até a formação de H_2O , sendo que cerca de 2-5% do O_2 inspirado, transforma-se em ERO (BRAWN; FRIDOVICH, 1980).

As ERN de maior importância biológica compreendem o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e seus derivados (BECKMAN, 1996). O NO^{\cdot} é um radical muito reativo, formado a partir da oxidação da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (WU; MORRIS, 1998). Embora esteja envolvido em importantes ações fisiológicas no organismo, tais como relaxamento da musculatura lisa e regulação da pressão arterial, este radical pode reagir com o O_2^- ou H_2O_2 , levando à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) (FRIDOVICH, 1999). Em pH fisiológico, o $ONOO^-$ é protonado, formando o ácido peroxinitroso ($ONOOH$), o

qual se dissocia rapidamente em duas potentes espécies reativas radicalares, o radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$) e o dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2\cdot$) (BECKMAN, 1996).

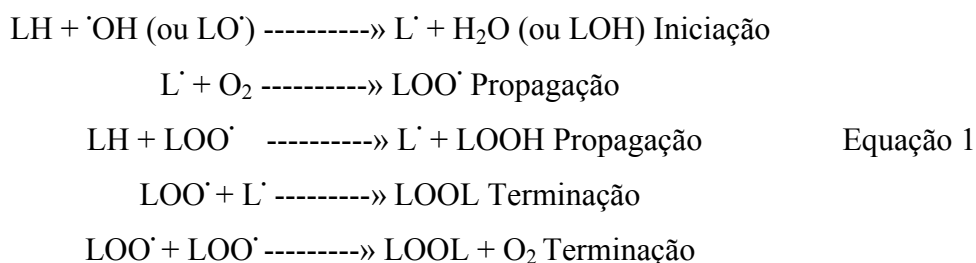
No organismo, as ERO e ERN encontram-se envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização celular e síntese de substâncias biológicas importantes (LANDER, 1997; FRIDOVICH, 1999). Entretanto, como oxidantes, as ERO e ERN causam efeitos prejudiciais, tais como a oxidação do DNA, proteínas, aminoácidos, lipídeos e outras biomoléculas, resultando em uma variedade de conseqüências biológicas, incluindo lesão tecidual, mutação, carcinogênese, comprometimento do sistema imunológico e morte celular (MCCORD, 2000; STOHS, 1996). Desta forma, as ERO e as ERN encontram-se relacionadas com várias doenças, tais como artrite reumatóide, choque hemorrágico, doenças cardiovasculares, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (HALLIWELL et al., 1992).

Quadro 1 - Espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Modificado de HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

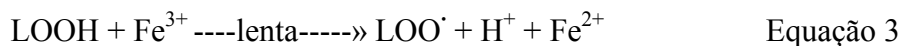
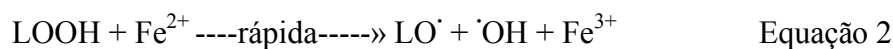
	Radicais	Não Radicais
ERO	Superóxido, $\text{O}_2\cdot^-$	Peróxido de hidrogênio, H_2O_2
	Hidroxil, $\text{OH}\cdot$	Ácido hipocloroso, HOCL
	Peroxil, $\text{ROO}\cdot$	Ozônio, O_3
	Alcoxil, $\text{RO}\cdot$	Oxigênio singlet, $^1\Delta\text{g}$
	Hidroperoxil, $\text{HOO}\cdot$	
ERN		Ácido nitroso, HNO_2
		Cátion nitrosil, NO^+
	Óxido nítrico, $\text{NO}\cdot$	Ânion nitrosil, NO^-
	Dióxido de nitrogênio, $\text{NOO}\cdot$	Tetróxido dinitrogênio, N_2O_4
		Trióxido dinitrogênio, N_2O_3
		Peroxinitrito, ONOO^-
		Ácido peroxinitroso, ONOOH
		Cátion nitrônio, NO_2^+
	Alquil peroxinitrito, ROONO	

A reação característica das ERO com os ácidos graxos polinsaturados (AGP), presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas do sangue, constitui a

lipoperoxidação (LPO). A oxidação dos AGP em sistemas biológicos é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (Equação 1). A etapa de iniciação é caracterizada pelo seqüestro de um átomo de hidrogênio do AGP da membrana celular. Este seqüestro pode ser realizado por oxidantes como $\cdot\text{OH}$ ou $\text{RO}\cdot$, com conseqüente formação de um radical lipídico ($\text{L}\cdot$). Na primeira equação da propagação, o $\text{L}\cdot$ reage rapidamente com o O_2 , produzindo um radical peroxil ($\text{LOO}\cdot$), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do AGP, produzindo um hidroperóxido lipídico (LOOH), enquanto gera um novo $\text{L}\cdot$ na segunda equação da propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais $\text{L}\cdot$ e $\text{LOO}\cdot$ propagam-se até destruírem-se a si próprios (DE GROOT, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).



A LPO pode ser catalisada por íons de ferro e cobre, por conversão dos LOOH em radicais altamente reativos, como o alcóxil ($\text{LO}\cdot$) e peroxil ($\text{LOO}\cdot$), que, por sua vez iniciam nova cadeia de reações, denominada ramificação. Essas reações podem ser rápidas (Equação 2) ou lentas (Equação 3), dependendo da valência do ferro, conforme demonstrado abaixo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).



A LPO acarreta em alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares, com conseqüente perda de seletividade nas trocas iônicas e liberação do conteúdo de organelas, além da formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído (MDA), resultando na morte celular (HERSHKO, 1989). Além disso, a LPO também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento e câncer (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

2.3.2 Antioxidantes

A proteção do organismo contra o excesso de ERO e ERN abrange um sistema de defesa antioxidante, que pode ser produzido pelo próprio corpo ou absorvido através da dieta (HALLIWELL, 1996a). De acordo com Halliwell e Gutteridge (1999), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração, comparada àquela do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo.

Na proteção ao organismo, o sistema de defesa antioxidante pode atuar em duas linhas. O primeiro mecanismo de proteção atua como detoxificador das ERO e ERN, impedindo a sua formação e, conseqüentemente, o ataque sobre os lipídeos, proteínas, e as bases do DNA, evitando assim, a formação de lesões e perda da integridade celular. O outro mecanismo de defesa tem a função de reparar as lesões provocadas pelas espécies reativas. Este processo relaciona-se com a remoção de danos da molécula de DNA e reconstituição das membranas celulares (SIES, 1993).

Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona S-transferase (GST), glutathiona redutase (GR) catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), que convertem as espécies reativas em outros radicais menos tóxicos, ou não enzimaticamente, a exemplo da glutathiona reduzida (GSH), bilirrubina, ubiquinona, ácido úrico e proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) (HALLIWELL, 1996a). Assim, os antioxidantes sintetizados pelo organismo são denominados antioxidantes endógenos e podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SIES, 1993). Além dos antioxidantes produzidos endogenamente, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como a vitamina E (α -tocoferol), vitamina A (β -caroteno), vitamina C (ácido ascórbico), zinco e selênio (HALLIWELL, 1996a; SIES, 1993) (Quadro 2).

Destacam-se três principais sistemas enzimáticos antioxidantes. O primeiro sistema de prevenção é formado pela enzima superóxido dismutase (SOD), presente no organismo sob duas formas. A primeira contém Cu^{2+} e Zn^{2+} como cofator no sítio ativo e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. A segunda contém Mn^{2+} como cofator no sítio ativo, ocorre na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo. A SOD catalisa a destruição do radical ânion superóxido (O_2^-),

convertendo-o em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DIPLOCK et al., 1998; HALLIWELL, 1996a).

O segundo sistema de prevenção é constituído pela enzima catalase (CAT), uma hemoproteína encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado, que atua na dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio (O_2) e água (H_2O) (DIPLOCK et al., 1998; HALLIWELL, 1996a).

Quadro 2 - Principais antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Modificado de VANNUCCHI et al., 1998).

Antioxidantes enzimáticos	Antioxidantes não enzimáticos
Superóxido Dismutase (SOD)	Glutationa reduzida (GSH)
Catalase (CAT)	Ácido úrico
Glutationa peroxidase (GPx)	Ácido ascórbico
Glutationa redutase (GR)	Transferrina
Glutationa S-Transferase (GST)	Lactoferrina
	Haptoglobulina
	Albumina
	Vitamina E (tocoferóis)
	Vitamina A (carotenóides)
	Bilirrubina
	Zinco e selênio

O terceiro sistema de defesa é composto pelas enzimas glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR) que atuam em conjunto com a glutaciona reduzida (GSH), um antioxidante não enzimático. A GPx catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos em água e seus correspondentes álcoois às custas da oxidação da GSH à glutaciona oxidada (GSSG). A GPx ocorre no organismo de duas formas diferentes: selênio dependente e selênio independente. A presença de selênio na enzima explica a importância desse metal e sua atuação como antioxidante nos organismos vivos. A GR, uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida (NADPH) tem a função de regenerar a GSH (BARREIROS et al., 2006; BIANCHI; ANTUNES, 1999; FANG et al., 2002; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O processo de regeneração da GSH favorece a manutenção da concentração intracelular elevada de GSH em relação à GSSG (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A GSH está presente na maioria das células e é o composto tiol (-SH) de baixo peso molecular mais abundante no meio intracelular, constituindo-se um dos mais importantes antioxidantes do sistema de defesa da célula. A GSH é considerada um antioxidante endógeno e exógeno, uma vez que ela pode ser tanto proveniente da dieta quanto sintetizada pelo organismo (FANG et al., 2002). Seu grupo tiol reativo (SH) lhe confere efetiva propriedade redutora, permitindo-lhe interagir com diversas moléculas reativas, tais como hidroperóxidos lipídicos (LOOH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$) e radicais superóxido (O_2^-) e hidroxil (OH). Além disso, a GSH tem importante participação no processo de regeneração da vitamina C (BARREIROS et al., 2006; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Dentre outros antioxidantes biológicos não enzimáticos podem ser destacados os carotenóides, tocoferóis, ácido ascórbico, bilirrubina, ubiquinona, albumina e ácido úrico. Carotenóides, ácido ascórbico e vitamina E (tocoferol) são também considerados antioxidantes exógenos, uma vez que podem ser adquiridos através da dieta (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Entre os antioxidantes provenientes da dieta, ou exógenos, podemos citar os mais estudados no combate ao estresse oxidativo a vitamina A e a vitamina E, antioxidantes lipossolúveis, a vitamina C, o principal antioxidante hidrossolúvel, flavonóides e outros compostos fenólicos, os minerais zinco, selênio e cobre, além de compostos bioativos encontrados em plantas (BARREIROS et al., 2006; BIANCHI; ANTUNES, 1999; FANG et al., 2002).

O β -caroteno é o mais importante precursor da vitamina A, considerado um potente antioxidante originado das plantas, sendo eficiente na neutralização de ERO (FANG et al., 2002). Os carotenóides agem como neutralizadores do oxigênio singlet ($^1\Delta g$) ou como sequestradores dos radicais peroxil (ROO^\cdot), reduzindo a oxidação do DNA e lipídeos, que está associada a doenças degenerativas, como câncer e doenças cardíacas (BARREIROS et al., 2006). Neste sentido, o β -caroteno, como antioxidante lipossolúvel, protege contra a peroxidação lipídica nos tecidos (FANG et al., 2002).

Os retinóides, precursores de vitamina A, estão envolvidos em processos fisiológicos, tais como crescimento e diferenciação celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Atuam como neutralizadores de ERO, protegendo as células dos danos oxidativos (MUINDI, 1996). Em estudos realizados com animais, a vitamina A tem apresentado ação

preventiva no desenvolvimento de tumores da bexiga, mama, estômago e pele (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A vitamina E é uma substância lipossolúvel, constituída por quatro tocoferóis (α , β , γ , δ) e por quatro tocotrienóis (α , β , γ , δ), sendo o α -tocoferol a forma antioxidante amplamente distribuída nos tecidos e no plasma (BARREIROS et al., 2006; BIANCHI; ANTUNES, 1999). A vitamina E interrompe a propagação das reações em cadeia e impede a LPO induzida pelas espécies reativas nas membranas biológicas (BARREIROS et al., 2006; BIANCHI; ANTUNES, 1999; FANG et al., 2002).

Quando em seu estado oxidado, o radical α -tocoferoxil pode funcionar como um agente pró-oxidante, apesar de ter toxicidade muito baixa (FANG et al., 2002).

O ácido ascórbico, ou vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel presente nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos, comumente encontrada na forma de ascorbato (BARREIROS et al., 2006). A vitamina C, além de atuar como antioxidante convertendo as ERO e ERN em espécies menos ofensivas, regenera a glutatona e a vitamina E. O ascorbato regenera a vitamina E, doando um hidrogênio ao radical α -tocoferoxil formado na inibição da LPO (BARREIROS et al., 2006; BIANCHI; ANTUNES, 1999; FANG et al., 2002).

A oxidação da vitamina C, no processo de reciclagem da vitamina E, produz o radical desidroascorbato que é pouco reativo. Este radical, por sua vez, pode ser regenerado a ascorbato através de um sistema enzimático que envolve a glutatona (BARREIROS et al., 2006; FANG et al., 2002).

No entanto, estudos *in vitro* mostraram que a vitamina C possui propriedades pró-oxidantes, por reduzir metais de transição, em particular Fe^{+3} e Cu^{+2} , respectivamente, a Fe^{+2} e Cu^{+} , que podem reagir com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formando o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), que, por sua vez, induz a LPO (BARREIROS et al., 2006; BIANCHI; ANTUNES, 1999; DRAPER; BETTGER, 1994; FANG et al., 2002). Porém, em função destes metais estarem geralmente disponíveis em quantidades muito limitadas, a propriedade antioxidante da vitamina C predomina sob sua propriedade pró-oxidante (BARREIROS et al., 2006; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A propriedade antioxidante de alguns minerais está relacionada principalmente à atuação destes como cofatores de certas enzimas que compõem o sistema enzimático de defesa contra as ERO e ERN (WILLET, 2001; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

2.3.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um termo utilizado para caracterizar o desequilíbrio entre as concentrações das ERO e ERN e os mecanismos de defesa antioxidantes do organismo, que resulta em dano oxidativo a biomoléculas como DNA, lipídeos e proteínas (DOTAN et al., 2004; SIES, 1986). Este distúrbio pode ocorrer pelo aumento dos pró-oxidantes (ERO e ERN) sem o concomitante aumento das defesas antioxidantes, porém em outras situações, os antioxidantes podem estar diminuídos sem o aumento das ERO e ERN; ou ainda, pode ocorrer uma situação muito mais crítica, em que há o aumento da concentração das ERO e ERN acompanhado de uma redução da proteção antioxidante (DOTAN et al., 2004; SIES, 1986).

O estresse oxidativo está associado a diversos processos patológicos tais como a carcinogênese, mutagênese, aterogênese, envelhecimento, entre outros (FANG et al., 2002). Os danos mais graves causados pelas ERO e ERN são aqueles relacionados ao DNA e RNA. O ataque intensivo e freqüente das ERO e ERN ao DNA, sem o conseqüente reparo das lesões pelos antioxidantes, promove a mutação do material genético, cujo acúmulo pode desencadear o processo de carcinogênese, resultando no desenvolvimento de neoplasias (BARREIROS et al., 2006). Neste sentido, no processo de carcinogênese o estresse oxidativo está relacionado, freqüentemente, às fases de iniciação e promoção da neoplasia (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

De acordo com Halliwell (1996b), as ERO e ERN mais potentes em promover a mutação do material genético incluem: radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), oxigênio singlet ($^1\Delta\text{g}$), radicais peroxil ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxil ($\text{RO}\cdot$), ozônio (O_3), ácido nitroso (HNO_2), peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$) e seus produtos de decomposição.

Há diversos e complexos métodos para avaliar o estado de estresse oxidativo, os quais variam de acordo com as condições experimentais, das facilidades de instalações para análises e do interesse do investigador. Devido à falta de um método padrão ouro para a detecção dos danos oxidativos causados pelas espécies reativas, três metodologias têm sido grandemente empregadas: 1) a determinação da concentração de antioxidantes; 2) determinação de indicadores indiretos da atividade das espécies reativas, como por exemplo, a detecção de produtos derivados da oxidação de macromoléculas; e 3) avaliação direta das espécies reativas (JACKSON, 1999).

Para a determinação da capacidade antioxidante, muitos estudos têm examinado a concentração de antioxidantes no sangue e nas células e/ou determinado a atividade celular de enzimas antioxidantes (FANG et al., 2002). Em virtude da dificuldade de se avaliar todos os antioxidantes conhecidos separadamente, e devido às interações entre os diferentes tipos de antioxidantes, várias técnicas têm sido propostas para a avaliação da capacidade antioxidante total dos fluidos biológicos (BENZIE; STRAIN, 1996; CAO; PRIOR, 1998; EVELSON et al., 2001; GHISELLI et al., 2000; WAYNER et al., 1985).

Em relação à detecção de produtos derivados da oxidação de macromoléculas, destaca-se a utilização de indicadores da peroxidação lipídica, tais como hidroperóxidos lipídicos, isoprostanos, dienos conjugados e MDA (JACKSON, 1999). Além destes parâmetros, a avaliação de proteínas oxidadas, denominadas carbonilas e, de grupos tióis protéicos são considerados indicadores válidos da oxidação protéica pelas espécies reativas. Para avaliar a oxidação do DNA, alguns produtos específicos tem sido propostos como potentes marcadores deste processo, tais como 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, 5-OH-citosina, 8-OH-adenina e 8-OH-guanina (JACKSON, 1999).

A detecção direta de espécies reativas pode ser realizada através de técnicas de ressonância paramagnética de elétrons (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Embora esta técnica seja útil para detectar espécies reativas em sistemas biológicos, o seu elevado custo e outras limitações metodológicas dificultam seu uso rotineiro (FANG et al., 2002).

2.4 CÂNCER DE MAMA, ESTRESSE OXIDATIVO E ALIMENTAÇÃO

Câncer de mama: estresse oxidativo e alimentação

Breast cancer: oxidative stress and feeding

Artigo de revisão encaminhado à revista FEMINA (Qualis C Internacional) (ANEXO A)

Responsável pela correspondência: Francilene Gracieli Kunradi Vieira. Secretária do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Universitário. Trindade, Cep 880109970. Florianópolis/SC - Brasil. Fone (048) 37218014; Fax (048) 37219542. E-mail: frankunradi@gmail.com

Resumo

O câncer de mama apresenta-se como uma das maiores causas de morbi-mortalidade em todo o mundo. O estresse oxidativo resultante de um desequilíbrio entre a produção e neutralização de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio pelos antioxidantes, parece exercer importante função no desenvolvimento da carcinogênese mamária. Além disso, existem hipóteses de que alguns constituintes específicos da alimentação podem aumentar ou diminuir o risco de câncer de mama por exercer seus efeitos diretamente sobre o estresse oxidativo ou sobre os hormônios sexuais. O objetivo deste artigo foi apresentar as evidências científicas sobre a associação entre o estresse oxidativo e alimentação no desenvolvimento do câncer de mama. Conclui-se que o estresse oxidativo pode exercer importante função no desenvolvimento da carcinogênese mamária, no entanto o papel específico da alimentação na promoção ou proteção do câncer de mama não se encontra completamente esclarecido, apesar de se tornar cada vez mais evidente que a qualidade da dieta e o estilo de vida contribuem para o desenvolvimento de diversas neoplasias como o câncer de mama.

Palavras-chave: câncer de mama, estresse oxidativo, alimentação

Abstract

Breast cancer is one the main causes of morbidity and mortality all over world. Oxidative stress resulting from an imbalance between the production and detoxification of reactive oxygen species and nitrogen and the antioxidants seems to play an important role in the development of breast carcinogenesis. Moreover there are evidences that some food constituents may increase or reduce the risk of breast cancer, acting directly over the oxidative stress or the sexual hormones. The aim of the present study was to present the scientific evidences about the association between the oxidative stress and feeding in breast cancer. In conclusion, oxidative stress can exercise an important role in the development of breast carcinogenesis. However the specific role of the foods in the promotion or protection of breast cancer is not completely elucidated, in spite of being more and more evident that the diet's quality and the lifestyle contribute to the development of several neoplasias as the breast cancer.

Keywords: breast cancer, oxidative stress, feeding

Introdução

O câncer de mama emerge como uma doença de importância cada vez maior em todas as partes do mundo, por sua elevada incidência e mortalidade. No Brasil, excluindo-se os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama constitui a neoplasia maligna de maior incidência e mortalidade entre as mulheres, sendo que para o ano de 2006, estimou-se o aparecimento de 48.930 casos novos desta neoplasia em todo o país, com uma taxa bruta de 52 por 100.000 mulheres (Brasil, 2005).

A neoplasia maligna da mama pode ser definida como uma doença caracterizada pela multiplicação e propagação descontrolada e anormal de células do tecido mamário, constituindo o resultado de um acúmulo progressivo de mutações no material genético (Waitzberg & Brentani, 2004). Segundo Halliwell (1996), estudos experimentais têm demonstrado que espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são fortemente capazes de alterar o material genético das células. As ERO e ERN constituem substâncias altamente reativas e instáveis que são produzidas no organismo, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, e quando estão em excesso procuram estabilidade, reagindo com constituintes celulares como proteínas, lipídeos, carboidratos e nucleotídeos, resultando no dano celular oxidativo ou estresse oxidativo (Halliwell, 1996).

O estresse oxidativo é um processo caracterizado pelo desequilíbrio entre a formação das ERO e ERN e a neutralização destas substâncias pelos antioxidantes (Halliwell, 1996). Nos últimos anos, diversos estudos têm analisado a associação do estresse oxidativo no desenvolvimento do câncer de mama (Khanzode *et al.*, 2004, Kumaraguruparan *et al.*, 2002, Polat *et al.*, 2002, Ray *et al.*, 2000, Sener *et al.*, 2007, Yeh *et al.*, 2005).

Em relação ao papel da alimentação no desenvolvimento da neoplasia maligna da mama, vários estudos epidemiológicos têm sido realizados com o intuito de esclarecer as evidências sobre os possíveis fatores dietéticos associados ao câncer de mama (Ahn *et al.*, 2004, Bartsch *et al.*, 1999, Holmes *et al.*, 2004, Lesperance *et al.*, 2002). As principais hipóteses sobre os efeitos da dieta no aumento do risco de câncer de mama são a obesidade, alta ingestão de carne vermelha, álcool e gordura, enquanto que o aumento da ingestão de fibras, frutas, verduras e alimentos fontes de antioxidantes podem reduzir o risco da doença (Key *et al.*, 2003). Quanto ao efeito protetor da alimentação contra o desenvolvimento do câncer de mama, tem sido postulado que as frutas e verduras podem

reduzir os níveis do estresse oxidativo devido à capacidade das vitaminas, minerais, polifenóis e outros constituintes presentes nestes alimentos atuarem como antioxidantes e inativarem as ERO e ERN, responsáveis pela alteração do material genético (Donaldson, 2004). Em contrapartida, dietas ricas em gordura têm sido postuladas por promover o desenvolvimento da carcinogênese mamária, em função deste constituinte da dieta atuar como um agente carcinogênico, favorecer o acúmulo de ERO e ERN e, assim, induzir o estresse oxidativo (Willett, 1998).

Considerando a elevada incidência e mortalidade do câncer de mama no Brasil e no mundo, e as evidências acerca do efeito do estresse oxidativo e da dieta no desenvolvimento da carcinogênese mamária, o presente artigo apresenta o panorama atual do conhecimento sobre a associação do estresse oxidativo e alimentação no câncer de mama.

Estresse oxidativo e câncer de mama

O estado de estresse oxidativo pode ser avaliado pela utilização de diversas e complexas metodologias. Devido à falta de um método padrão ouro para a detecção dos danos oxidativos causados pelas espécies reativas, três parâmetros tem sido grandemente empregados: 1) determinação da concentração de antioxidantes totais ou individuais; 2) determinação de indicadores indiretos da atividade das espécies reativas, como por exemplo, a detecção de produtos derivados da oxidação de macromoléculas, tais como malondialdeído (MDA), hidroperóxidos lipídicos, proteína carbonilada; e 3) avaliação direta das espécies reativas (Jackson, 1999). Utilizando-se alguns destes métodos citados, diversos estudos têm investigado a associação entre estresse oxidativo e o câncer de mama (Khanzode *et al.*, 2004, Kumaraguruparan *et al.*, 2002, Polat *et al.*, 2002, Ray *et al.*, 2000, Sener *et al.*, 2007, Yeh *et al.*, 2005).

Sener *et al.*, 2007, determinaram o estado de estresse oxidativo, a partir da concentração sérica de antioxidantes totais e da peroxidação lipídica avaliada pela determinação de MDA e hidroperóxidos lipídicos, de mulheres com câncer de mama e mulheres saudáveis. Os autores observaram concentrações menores de antioxidantes totais e maiores de MDA nas pacientes com câncer de mama. A concentração dos hidroperóxidos lipídicos também foi maior nos casos, porém não diferente estatisticamente.

Kumaraguruparan *et al.*, 2002, observaram peroxidação lipídica aumentada, medida pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, com concomitante depleção dos antioxidantes, avaliado através das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona-S-transferase (GST), glutatona reduzida (GSH), vitaminas C e E, nas mulheres com câncer de mama quando comparadas com controles livre de doença.

Já Ray *et al.*, 2000, observaram uma taxa de produção de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), duas potentes ERO, concentração sérica de MDA e atividade das enzimas SOD e GPx, significativamente maiores nas mulheres com câncer de mama do que nas controles. Ao contrário, a atividade da enzima CAT foi significativamente menor nas mulheres com câncer de mama. Resultados semelhantes foram observados por Yeh *et al.*, 2005, que avaliaram a relação entre estresse oxidativo e câncer de mama, a partir da análise sanguínea da taxa de produção de superóxido (O_2^-), concentração de MDA, avaliação da atividade enzimática da SOD, GPx e glutatona redutase (GR), níveis de GSH, glutatona oxidada (GSSG) e das vitaminas A, C e E. A taxa de produção de superóxido, concentração de MDA e atividade enzimática antioxidante no sangue das mulheres com câncer de mama foram significativamente maior do que nas controles. Entretanto, os níveis de vitamina C, GSH, GSSG e razão GSH/GSSG, no sangue das mulheres com câncer de mama, foram significativamente menores. As vitaminas A e E foram também menores nos casos, porém sem diferença significativa.

Polat *et al.*, 2002, avaliaram as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de MDA e a atividade enzimática da SOD, CAT e GPx. Os autores observaram que todos os parâmetros analisados foram significativamente maiores nas mulheres com câncer de mama em comparação com controles sem doença. Khanzode *et al.*, 2004, avaliaram modificações nas concentrações de MDA e SOD e concentração plasmática de ácido ascórbico de acordo com o estadiamento do câncer de mama em comparação com mulheres livres de doenças. As concentrações de MDA e SOD aumentaram gradativamente do estágio I para o estágio IV do câncer de mama, quando comparado ao grupo controle. Em contraste, as concentrações plasmáticas de ácido ascórbico foram significativamente menores em todos os estádios da doença, comparados ao grupo controle. A diminuição mais pronunciada do ácido ascórbico foi nas mulheres com estádios III e IV da doença.

Os estudos que encontraram maior atividade do sistema enzimático de defesa antioxidante nas mulheres com câncer de mama explicam que seus resultados podem ser devido a um mecanismo de regulação compensatória, em resposta ao dano oxidativo aumentado neste grupo de mulheres (Ray *et al.*, 2000, Polat *et al.*, 2002, Yeh *et al.*, 2005). De acordo com Yeh *et al.*, 2005, este mecanismo pode ter sido induzido pelos oxidantes (ERO e ERN) que estimulam o aumento da expressão gênica das enzimas do sistema de defesa antioxidante.

Apesar das diferenças observadas entre os estudos, a maioria deles tem demonstrado um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, o que pode caracterizar a associação do estresse oxidativo com o câncer de mama.

Alimentação e câncer de mama

O campo de investigação acerca do papel da alimentação no processo carcinogênico é amplo. Estima-se que cerca de 30 a 40% de todos os tipos de câncer podem ser prevenidos pela adoção de uma dieta equilibrada, prática regular de atividade física e manutenção do peso corporal adequado (Donaldson, 2004).

No desenvolvimento da carcinogênese mamária, os estudos sugerem que os fatores nutricionais podem exercer seus efeitos diretamente sobre o dano oxidativo a macromoléculas ou sobre os níveis endógenos dos hormônios sexuais, que estimulam a proliferação de células do tecido mamário (Key *et al.*, 2003). Neste sentido, há evidências de que os fatores nutricionais relacionados ao aumento do dano oxidativo estão associados ao risco elevado de câncer, enquanto que, fatores nutricionais relacionados à prevenção ou diminuição do dano oxidativo, estão associados à prevenção com conseqüente redução do risco da doença (Donaldson, 2004).

A possível associação entre gordura da dieta e risco de câncer de mama tem sido foco de estudos epidemiológicos (Bartsch *et al.*, 1999, Shannon *et al.*, 2003). Esta associação parece estar relacionada à quantidade e o tipo de gordura ingerida. Segundo Key *et al.*, 2003, os mecanismos pelos quais a gordura da dieta pode aumentar o risco de câncer de mama não estão esclarecidos, apesar de ser proposto que esse alimento pode provocar um aumento na concentração endógena de estrógeno, que estimularia a proliferação das células epiteliais que formam os sacos alveolares e os ductos lactíferos da mama. De acordo com Bartsch *et al.*, 1999, uma dieta rica em gordura aumenta a

biodisponibilidade do estrogênio endógeno pelo aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres. Como já descrito anteriormente, o estrogênio tem sido relacionado com o câncer de mama, principalmente devido às suas ações fisiológicas estimulatórias nas glândulas mamárias.

O elevado consumo de carne vermelha tem sido um fator dietético positivamente associado ao risco de câncer de mama (Shannon *et al.*, 2003). De acordo com Zheng *et al.*, 1998, mulheres que consomem grandes quantidades de carne vermelha estão expostas a um elevado conteúdo de gordura saturada e de agentes mutagênicos, uma vez que esse alimento, cozido em altas temperaturas, contém hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e compostos N-nitrosos, potencialmente danosos ao tecido mamário.

O papel da fibra na redução do risco de câncer de mama tem sido investigado, sugerindo que um aumento no consumo de fibras, ou seja, frutas, vegetais e grãos integrais, podem reduzir o risco deste tipo de câncer (Gerber, 1998), apesar de grandes estudos prospectivos geralmente não suportarem estes achados (Holmes *et al.*, 2004). Há a hipótese de que as fibras protegem o organismo contra o câncer de mama ao inibir a reabsorção de estrógeno no cólon, promovendo, conseqüentemente, a redução da concentração plasmática deste hormônio, em função da quantidade aumentada de estrogênio excretado (Gerber, 1998).

A elevada ingestão de frutas e verduras pode estar associada à diminuição do risco de diversos tipos de câncer, em particular as neoplasias do trato digestivo (Donaldson, 2004). Em relação ao câncer de mama, alguns estudos têm observado que o elevado consumo de frutas e verduras apresenta efeito protetor (Adzersen *et al.*, 2003, Ahn *et al.*, 2004), apesar de existirem resultados conflituosos e inconsistentes (Shannon *et al.*, 2003). Atualmente, diversos estudos têm tentado identificar substâncias presentes nas frutas e verduras que poderiam ser responsáveis pela diminuição do risco do câncer de mama, tais como as fibras e os nutrientes antioxidantes (Nissen *et al.*, 2003, Terry *et al.*, 2002).

Dentre os micronutrientes antioxidantes mais investigados por sua ação protetora na carcinogênese mamária, encontram-se as vitaminas A, C e E e os minerais zinco e selênio (Lesperance *et al.*, 2002, Nissen *et al.*, 2003, Terry *et al.*, 2002,). As principais ações protetoras das vitaminas e minerais constituem a defesa contra ERO e ERN, responsáveis por causar danos ao ácido desoxiribonucléico (DNA), a regulação da diferenciação celular e, conseqüentemente, inibição do crescimento de células mamárias cancerígenas (Nissen *et al.*, 2003).

Alimentação, estresse oxidativo e câncer de mama

Apesar das evidências acerca do papel da alimentação e do estresse oxidativo no desenvolvimento do câncer de mama, na literatura são escassos os estudos que procuram investigar a existência de associação entre consumo alimentar, estresse oxidativo e câncer de mama.

Em um dos estudos encontrados, Djuric *et al.*, 1998, em um ensaio clínico randomizado realizado com mulheres sem câncer de mama, mas que tinham um parente de 1º grau com história desta neoplasia, examinaram a relação entre o consumo de carnes, verduras e frutas com as concentrações de 5-hidroximetilglutaril, um produto derivado da oxidação do DNA. As participantes foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (que não recebeu intervenção) e o grupo dieta pobre em gordura (recebeu orientações para consumir até 15% da energia total a partir da gordura) e acompanhadas por 12 meses. Os autores observaram uma associação positiva entre o consumo de carne bovina e suína e a oxidação do DNA e uma associação negativa entre o consumo de verduras, especialmente verduras cozidas, com a oxidação do DNA em mulheres que apresentam alto risco de desenvolver câncer de mama. De acordo com os autores, a associação entre o consumo de verduras cozidas e oxidação diminuída do DNA deve ser investigada, uma vez que a relação observada pode não ser atribuída à técnica de cocção por si só, mas principalmente aos tipos de vegetais que são usualmente consumidos cozidos.

Em outro estudo, Thomson *et al.*, 2005, avaliaram a associação entre o consumo alimentar de gordura total, gordura poliinsaturada, gordura saturada, ácido araquidônico, antioxidantes dietéticos e as concentrações dos danos oxidativos, medidos pela concentração urinária de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) e 8-epi-prostaglandin F2 α (8-iso-PGF2 α), biomarcadores da oxidação do DNA e lipídeos, respectivamente. Durante um ano, 179 mulheres previamente tratadas para o câncer de mama foram constantemente orientadas a consumir diariamente 5 porções de verduras, 3 porções de frutas, 30 gramas de fibras e entre 15 a 20% da energia total a partir das gorduras. O consumo alimentar e os parâmetros bioquímicos foram avaliados antes e após um ano de intervenção. Os resultados demonstraram que após o período de intervenção houve uma redução significativa do consumo de gordura total, poliinsaturada e saturada e um significativo aumento no consumo de vitamina C, vitamina E e β -caroteno. Análises de regressão,

utilizando dados antes e após um ano de intervenção mostraram que o consumo de vitamina E foi inversamente associado aos dois parâmetros utilizados para avaliar os danos oxidativos. Neste estudo, observou-se também que a concentração urinária de 8-iso-PGF₂ α foi elevada com o aumento do Índice de Massa Corporal (IMC) e consumo de gordura poliinsaturada, indicando que ocorre um aumento na peroxidação lipídica com um IMC elevado e maior consumo de gordura poliinsaturada. Já o 8-OHdG foi positivamente relacionado ao consumo de ácido araquidônico, encontrado principalmente na carne vermelha, indicando que um aumento no dano oxidativo ao DNA pode ocorrer com o aumento do consumo de ácido araquidônico.

Considerações finais

Os resultados dos estudos sugerem que o estresse oxidativo exerce função importante no desenvolvimento da carcinogênese mamária. O papel específico da alimentação na promoção ou proteção do câncer de mama não se encontra completamente esclarecido, apesar de se tornar cada vez mais evidente que a qualidade da dieta e o estilo de vida contribuem para o desenvolvimento de diversas neoplasias como o câncer de mama.

Os estudos existentes que investigaram a associação entre alimentação, estresse oxidativo e câncer de mama observaram que alguns constituintes da dieta podem influenciar o estado de estresse oxidativo, no entanto, nenhuma conclusão pode ainda ser definida, pois se trata de uma doença multifatorial cujos processos ainda não estão totalmente esclarecidos. Futuramente, os resultados de novos estudos poderão conduzir a implementação de condutas que promovam uma diminuição do estresse oxidativo com conseqüente redução do risco e incidência do câncer de mama, assim como aumentar a proteção contra os danos oxidativos provocados pela doença e seu tratamento, possibilitando menor prejuízo fisiológico.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de mestrado a FGK Vieira.

Leituras Suplementares

Adzersen KH, Jess P, Freivogel KW, Gerhard I, *et al.* Raw and cooked vegetables, fruits, selected micronutrients, and breast cancer risk: a case-control study in Germany. *Nutr Cancer* 2003; 46:131-7.

Ahn J, Gammon MD, Satella RM, *et al.* Myeloperoxidase genotype, fruit and vegetable consumption, and breast cancer risk. *Cancer Res* 2004; 64:7634-9.

Bartsch H, Nair J & Owen RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 1999; 20:2209-18.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Djuric Z, Depper JB, Uhley V, *et al.* Oxidative DNA damage levels in blood from women at high risk for breast cancer are associated with dietary intakes of meats, vegetables, and fruits. *J Am Diet Assoc* 1998; 98:524-8.

Donaldson MS. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr J* 2004; 3:1-21.

Gerber M. Fibre and breast cancer. *Eur J Cancer Prev* 1998; 7(suppl. 2):63-7.

Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res* 1996; 25:57-74.

Holmes MD, Liu S, Hankinson SE, *et al.* Dietary carbohydrates, fiber, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 2004; 159:732-9.

Jackson MJ. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. *Proc Nutr Soc* 1999; 58:1001-6.

Key TJ, Allen NE, Spencer EA & Travis RC. Nutrition and breast cancer. *Breast* 2003; 12:412-6.

Khanzode SS, Muddeshawar MG, Khanzode SD & Dakhale GN. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different stages of breast cancer. *Free Radic Res* 2004; 38:81-5.

Kumaraguruparan R, Subapriya R, Kabalimoorthy J & Nagini S. Antioxidant profile in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast. *Clin Biochem* 2002; 35:275-9.

Lesperance ML, Olivotto LA, Forde N, *et al.* Mega-dose vitamins and minerals in the treatment of non-metastatic breast cancer: an historical cohort study. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 76:137-43.

- Nissen SB, Tjonneland A, Stripp C, *et al.* Intake of vitamins A, C, and E from diet and supplements and breast cancer in postmenopausal women. *Cancer Causes Control* 2003; 14:695-704.
- Polat MF, Taysi S, Gul M, *et al.* Oxidant/antioxidant status in blood of patients with malignant breast tumour and benign breast disease. *Cell Biochem Funct* 2002; 20:327-31.
- Ray G, Batra S, Shukla NK, *et al.* Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59:163-70.
- Sener ED, Gonenc A, Akinci M & Torun M. Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. *Cell Biochem Funct.* 2007; 25:377-82.
- Shannon J, Cook LS & Stanford JL. Dietary intake and risk of postmenopausal breast cancer (United States). *Cancer Causes Control* 2003; 14:19-27.
- Terry P, Jain M, Miller AB, *et al.* Dietary carotenoids and risk of breast cancer. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:883-8.
- Thomson CA, Giuliano AR, Shaw JW, *et al.* Diet and biomarkers of oxidative damage in women previously treated for breast cancer. *Nutr Cancer* 2005; 51:146-54.
- Waitzberg AFL & Brentani MM. Nutrição e câncer de mama. In: Waitzberg DL, editor. *Dieta, nutrição e câncer*. Rio de Janeiro: Atheneu; 2004. p.224-30.
- Willett WC. Dietary fat intake and cancer risk: a controversial and instructive story. *Semin Cancer Biol* 1998; 8:245-53.
- Yeh CC, Hou MF, Tsai SM, *et al.* Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clin Chim Acta* 2005; 361:104-11.
- Zheng W, Gustafson DR, Sinha R, *et al.* Well-done meat intake and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1724-9.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEMUYIWA, F. O.; OLOPADE, O. I. Racial differences in genetic factors associated with breast cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 22, p. 47-53, 2003.

ADZERSEN, K. H.; JESS, P.; FREIVOGEL, K. W.; GERHARD, I.; BASTERT, G. Raw and cooked vegetables, fruits, selected micronutrients, and breast cancer risk: a case-control study in Germany. **Nutrition and Cancer**, v. 46, p. 131-137, 2003.

AHN, J.; GAMMON, M. D.; SATELLA, R. M.; GAUDET, M. M.; BRITTON, J. A.; TEITELBAUM, S. L.; et al. Myeloperoxidase genotype, fruit and vegetable consumption, and breast cancer risk. **Cancer Research**, v. 64, p. 7634-7639, 2004.

AL-DELAIMY, W. K.; CHO, E.; CHEN, W. Y.; COLDITZ, G.; WILLETT, W. C. A prospective study of smoking and risk of breast cancer in young adult women. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 13, p. 398-404, 2004.

AMORIM, L. M. E.; ROSSINI, A.; MENDONÇA, G. A. S.; LOTSCH, P. F.; SIMÃO, T. A.; GALLO, C. V. M.; et al. CYP1A1, GSTM1, ANDGSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in brazilian women. **Cancer Letters**, v. 181, p. 179-186, 2002.

ATALAH, E. S.; URTEAGA, C. R.; REBOLLEDO, A. A.; MEDINA E. L.; CSENDES A. J. Factores de riesgo del cáncer de mama en mujeres de Santiago. **Revista Médica de Chile**, v. 128, n. 2, p. 137-143, 2000.

ATHAR, M. Oxidative stress and experimental carcinogenesis. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 40, p. 656-667, 2002.

BARACAT, F. F.; OLIVEIRA A. B. Câncer de mama. In: ABRÃO, F. S. **Tratado de Oncologia Genital e Mamária**. São Paulo: Roca, 1995.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BARROS, A. C. S. D.; MOTTA, E. V.; BUNDUKY, V.; MELO N. R.; SOUZA, A. Z.; PINOTTI, J. A. Estudo do perfil lipídico em mulheres com câncer de mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 18, p. 201-206, 1996.

BARTSCH, H.; NAIR, J.; OWEN, R. W. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 2209-2218, 1999.

BECKMAN, J. S. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. **Chemical Research in Toxicology**, v. 9, p. 836-844, 1996.

BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; TEIXEIRA, V. R.; CHAMMAS, R. Aspectos moleculares da transformação celular: conceitos e implicações. In: WAITZBERG, D. L. **Dieta, Nutrição e Câncer**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativas 2008: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Instituto Nacional de Câncer. **TNM: classificação de tumores malignos**. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria nacional de assistência à saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional**. 3 ed. Rio de Janeiro: INCA, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria nacional de assistência à saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-1999**. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

BRAWN, K.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense. **Acta Physiologica Scandinavica**, suppl. 492, p. 9-18, 1980.

CAO, G.; PRIOR, R. L.; Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 1309-1315, 1998.

CHIAGURI, P. Reactive oxygen species as mediators of cell adhesion. **The Italian Journal of biochemistry**, v. 52, p. 28-32, 2003.

CLEMENTS, M. Free radicals in chemical carcinogenesis. **Klinische Wochenschrift: Germany**, v. 23, p. 1123-34, 1991.

CONTRERAS, P. O.; PIERRE, B.; PONCE, E. L.; RODRIGUEZ, J. V.; VALENCIA, H. J. P. Factores de riesgo reproductivo asociados al cáncer mamario, en mujeres colombianas. **Revista de Saúde Pública**, v. 3, p. 237-245, 1999.

CONWAY, K.; SHARON, E. N.; CUI, L.; DROUIN, S. S.; PANG, J.; HE, M.; et al. Prevalence and spectrum of *p53* mutations associated with smoking in breast cancer. **Cancer Research**, v. 62, p. 1987-1995, 2002.

DE GROOT, H. Reactive oxygen species in tissue injury. **Hepato-Gastroenterology**, v. 41, p. 328-332, 1994.

DIETZ, A. T.; NEWCOMB, P. A.; STORER, B. E.; LONGNECKER, M. P.; BARON, J.; GREENBERG, E. R.; et al. Body size and risk of breast cancer. **American Journal of Epidemiology**, v. 145, p. 1011-1019, 1997.

DIEZ, O.; GUTIERREZ-ENRIQUEZ, S.; RAMON, C. T. Breast cancer susceptibility genes. **Medicina Clinica**, v. 126, p. 304-310, 2006.

DIPLOCK, A. T.; CHARLEUX, J. L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F. J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; et al. Functional food science and defense against reactive oxidative species. **The British Journal of Nutrition**, v. 80, p. 77S-112S, 1998.

DJURIC, Z.; DEPPER, J. B.; UHLEY, V.; SMITH, D.; LABABIDI, S.; MARTINO, S.; et al. Oxidative DNA damage levels in blood from women at high risk for breast cancer are associated with dietary intakes of meats, vegetables, and fruits. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 98, p. 524-528, 1998.

DONALDSON, M. S. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. **Nutrition Journal**, v.3, p. 1-21, 2004.

DORGAN, J. F.; BAER, D. J.; ALBERT, P. S.; JUDD, J. T.; BROWN, E. D.; CORLE, D. K.; et al. Serum hormones and the alcohol breast cancer association in postmenopausal women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, p. 710-715, 2001.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 200-227, 2004.

DRAPER, H. H.; BETTGER, W. J. Role of nutrients in the cause and prevention of oxygen radical pathology. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 366, p. 269-289, 1994.

EL-BAYOUMY. Environmental carcinogens that may be involved in human breast cancer etiology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, p. 585-590, 1992.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S.; LISSI, E. A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 388, p. 261-266, 2001.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, GUOYAO. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FRASER, G. E.; SHAVLIK, D. Risk factors, lifetime risk, and age at onset of breast cancer. **Annals of Epidemiology**, v. 7, p. 375-382, 1997.

FRIDOVICH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 893, p. 13-18, 1999.

GERBER, M. Fibre and breast cancer. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 7, p. 63-67, 1998.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 1106-1114, 2000.

GOMES ALRR, GUIMARÃES MDC, GOMES CC, CHAVES IG, GOBBI H, CAMARGOS AF. A case-control study of risk factors for breast cancer in Brazil. **International Journal of Epidemiology**, v. 24, p. 292-299, 1995.

GOMES, A. L. R. R.; GUIMARÃES, M. D. C.; GOMES, C. C.; CHAVES, L. G.; GOBBI, H.; CAMARGOS, A. F. Risk factors for breast cancer among pré- or post-menopausal women in Belo Horizonte, Brazil. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 52, p. 173-179, 2001.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, p. 227-234, 2005.

HALL, I. J.; NEWMAN, B.; MILLIKAN, R. C.; MOORMAN, P. G. Body size and breast cancer risk in black women and White women. **American Journal of Epidemiology**, v. 151, p. 754-764, 2000.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**. v. 16, p. 33-50, 1996a.

HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Research**, v. 25, p. 57-74, 1996b.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3 ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, p. 598-620, 1992.

HANAOKA, T.; YAMAMOTO, S.; SOBUE, T.; SASAKI, S.; TSUGANE, S. Active and passive smoking and breast cancer risk in middle-aged Japanese women. **International Journal of Cancer**, v. 114, p. 317-322, 2005.

HARDY, E. E.; PINOTTI, J. A.; ALGABA, M. F. O.; OSIS, M. J. D.; FAGUNDES, A. variáveis reprodutivas e risco para câncer de mama. Estudo caso-controle desenvolvido em Campinas, São Paulo. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 11, p. 212-216, 1989.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, v. 26, p. 277-285, 1989.

HOFFMANN, D.; HOFFMANN, I.; EL-BAYOUMY, K. The less harmful cigarette: a controversial issue. attribute to Ernst L. Wynder. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, p. 767-790, 2001.

HOLMES, M.D.; LIU, S.; HANKINSON, S. E.; COLDITZ, G. A.; HUNTER, D. J.; WILLETT, W. C. Dietary carbohydrates, fiber, and breast cancer risk. **American Journal of Epidemiology**, v. 159, p. 732-739, 2004.

JACKSON, M. J. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, p 1001-1006, 1999.

KALACHE, A.; MAGUIRE, A.; THOMPSON, S. G. Age at last full-term pregnancy and risk of breast cancer. **Lancet**, v. 341, p. 33-36, 1993.

KELSEY, J. L. Breast cancer epidemiology: summary and future directions. **Epidemiologic Reviews**, v. 15, p. 258-263, 1993.

KENEMANS, P.; VERSTRAETEN, R. A.; VERHEIJEN, R. H. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. **Maturitas**, v. 49, p. 34-43, 2004.

KEY, T. J.; ALLEN, N. E.; SPENCER, E. A.; TRAVIS, R. C. Nutrition and breast cancer. **The Breast**, v. 12, p. 412-416, 2003.

KHANZODE, S. S.; MUDDESHAWAR, M. G.; KHANZODE, S. D.; DAKHALE, G. N. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different stages of breast cancer. **Free Radical Research**, v. 38, p. 81-85, 2004.

KITCHEN, A. J.; TRIVEDI, P.; NG, D.; MOKBEL, K. Is there a link between breast cancer and abortion: a review of the literature. **International Journal of Fertility and Women's Medicine**, v. 50, p. 267-271, 2005.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 239-267, 2004.

KUMARAGURUPARAN, R.; SUBAPRIYA, R.; KABALIMOORTHY, J.; NAGINI, S. Antioxidant profile in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 275-279, 2002.

LAING, A. E.; DEMENAI, F. M.; WILLIAMS, R.; KISSLING, G.; CHEN, V. W.; BONNEY, G. E. Breast cancer risk factors in African-American women: the Howard University Tumor Registry experience. **Journal of the National Medical Association**, v. 85, p. 931-939, 1993.

LAMAS, J. M.; PEREIRA, M. G. Fatores de risco para o câncer de mama e para lesões pré-malignas em mulheres assintomáticas no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 9, p. 108-114, 1999.

LANDER, H. M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. **The FASEB Journal**, v. 11, p. 118-124, 1997.

LESPERANCE, M. L.; OLIVOTTO, L. A.; FORDE, N.; ZHAO, Y.; SPEERS, C.; FOSTER, H.; et al. Mega-dose of vitamins and minerals in the treatment of non-metastatic breast cancer: na historical cohort study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 76, p. 137-143, 2002.

LI, D.; ZHANG, W.; SAHIN, A.A.; HITTELMAN, W. N. DNA adducts in normal tissue adjacent to breast cancer: a review. **Cancer Detection and Prevention**, v. 23, p. 454-462, 1999.

LIMA, M. G.; KOIFMAN, S.; SCAPULATEMPO, I. L.; PEIXOTO, M.; NAOMI, S.; AMARAL, M. C. Fatores de risco para câncer de mama em mulheres indígenas Teréna de área rural, estado do mato grosso do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. 1537-1544, 2001.

LOFT, S.; POULSEN, H. E. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. **Journal of Molecular Medicine**, v. 74, p. 297-312, 1996.

MACMAHON, B.; PURDE, M.; CRAMER, D.; HINT, E. Association of breast cancer risk with age at first and subsequent births: a study in the population of the Estonian Republic. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 69, p. 1035-1038, 1982.

MAHON, S. M. Cancer risk assessment: conceptual considerations for clinical practice. **Oncology Nursing Forum**, v. 25, p. 1535-47, 1998.

MANJER, J.; JOHANSSON, R.; LENNER, P. Smoking is associated with postmenopausal breast cancer in women with high levels of estrogens. **International Journal of Cancer**, v. 112, p. 324-328, 2004.

MCCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 108, p. 652-659, 2000.

MEISTER, K.; MORGAN, J. Risk factors for breast cancer: a report by the American Council on Science and Health. 2000.

MILLER, A. B.; BULBROOK, R. D. UICC multidisciplinary project on breast cancer: the epidemiology, aetiology and prevention of breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 37, p. 173-177, 1986.

MUINDI, J. R. F. Retinoids in clinical cancer therapy. **Cancer Treatment and Research**, v. 87, p. 305-342, 1996.

NAGATA, C.; MIZOUE, T.; TANAKA, K.; TSUJI, I.; INOUE, M.; TSUGANE, S. Tobacco smoking and breast cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiological evidence among the Japanese population. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 36, p. 387-394, 2006.

NISSEN, S. B.; TJONNELAND, A.; STRIPP, C.; OLSEN, A.; CHRISTENSEN, J.; OVERVAD, K.; et al. Intake of vitamins A, C, and E from diet and supplements and breast cancer in postmenopausal women. **Cancer Causes and Control**, v. 14, p. 695-704, 2003.

OLIVEIRA, A. M.; ROSS, J. S.; FLETCHER, J. A. Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 124, p. S16-S28, 2005.

OLIVEIRA, V. M.; ALDRIGHI, J. M. Androgênios e câncer de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, p. 1-2, 2003.

PAIVA, C. E.; RIBEIRO, B. S.; GODINHO, A. A.; MEIRELLES, R. S. P.; SILVA, E. V. G. S.; MARQUES, G. D.; et al. Fatores de risco para câncer de mama em Juiz de Fora

(MG): um estudo caso controle. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, p. 231-237, 2002.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.; DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Journal of Cancer**, v. 37, suppl 8, p. S4-66, 2001.

POLAT, M. F.; TAYSI, S.; GUL, M.; CIKMAN, O.; YILMAZ, I.; BAKAN, E.; et al. Oxidant/antioxidant status in blood of patients with malignant breast tumour and benign breast disease. **Cell Biochemistry and Function**, v. 20, p. 327-331, 2002.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RAO, D. N.; GANESH, B.; DESAI, P. B. Role of reproductive factors in breast cancer in a low-risk area: a case-control study. **British Journal of Cancer**, v. 70, p. 129-132, 1994.

RAY, G.; BATRA, S.; SHUKLA, N. K.; DEO, S.; RAINA, V.; ASHOK, S.; et al. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 59, p. 163-170, 2000.

REIS, A. F. F.; COSTA, C. F. F.; MELLO, C. R.; ALMEIDA, F. M. L.; COSTA, H. L. F. F.; GABIATTI, J. R. E.; et al. Estudo epidemiológico do abortamento no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 17, p. 453-461, 1995.

SENER, E. D.; GONENC, A.; AKINCI, M.; TORUN, M. Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. **Cell Biochemistry and Function**, v. 25, p. 377-82, 2007.

SHANNON, J.; COOK, L. S.; STANFORD, J. L. Dietary intake and risk of postmenopausal breast cancer (United States). **Cancer Causes and Control**, v. 14, p. 19-27, 2003.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie**, v. 25, p. 1058-1071, 1986.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-19, 1993.

SINGLETERY, K. Ethanol and experimental breast cancer. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 21, 334-339, 1997.

SMITH-WARNER, S. A.; SPIEGELMAN, D.; YAUN, S. S.; BRANDT, P. A.; FOLSOM, A. R.; GOLDBOHM, D.; et al. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. **JAMA: the Journal of the American Medical Association**, v. 279, p. 535-540, 1998.

SOUZA, R. M.; DEFFERRARI, R.; LAZZARON, A. R.; SCHERER, L. BORBA, A. A.; FRASSON, A. L. Relação da história familiar em primeiro grau com câncer de mama. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 8, p. 123-128, 1998.

STOHS, S. J. The role free radicals in toxicity and disease. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 6, p. 205-28, 1996.

SWANSON, C. A.; COATES, R. J.; MALONE, K. E.; GAMMON, M. D.; SHOENBERG, J. B.; BROGAN, D. J.; et al. Alcohol consumption and breast cancer risk among women under age 45 years. **Epidemiology**, v. 8, p. 231-237, 1997.

TERRY, P.; JAIN, M.; MILLER, A. B.; HOWE, G. R.; ROHAN, T. E. Dietary carotenoids and risk of breast cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 883-888, 2002.

TESSARO S.; BÉRIA, J. U.; TOMASI, E.; BARROS, A. J. D. Contraceptivos orais e câncer de mama: estudo de casos e controles. **Revista de Saúde Pública**, v. 1, p. 32-38, 2001.

TESSARO, S.; BÉRIA, J. U.; TOMASI, E.; VICTORA, C. G. Breastfeeding and breast cancer: a case control study in southern Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 6, p. 1593-1601, 2003.

THOMSON, C. A.; GIULIANO, A. R.; SHAW, J. W.; ROCK, C. L.; RITENBAUGH, C. K.; HAKIM, I. A.; et al. Diet and biomarkers of oxidative damage in women previously treated for breast cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 51, p. 146-154, 2005.

THULER, L. C. Considerações sobre a prevenção do câncer de mama feminino. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, p. 227-238, 2003.

TOMATIS, L. Cancer: causes, occurrence and control. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**, 1990. (IARC scientific publication, n. 100)

TROLL, W.; FRENKEL, K.; TEEBOR, G. Free oxygen radicals: necessary contributors to tumor promotion and cocarcinogenesis. **Princess Takamatsu Symposia**, v. 14, p. 207-218, 1983.

URSIN, G.; LOGNECKER, M. P.; HAILE, R. W.; GREENLAND, S. A metaanalysis of body mass index and risk of premenopausal breast cancer. **Epidemiology**, v. 6, p. 137-141, 1995.

VAN DEN BRANDT, P. A.; GOLDBOHM, R. A.; VAN'T VEER, P. Alcohol and breast cancer: results from Netherlands cohort study. **American Journal of Epidemiology**, v. 141, p. 907-915, 1995.

VAN DEN BRANDT, P. A.; SPIEGELMAN, D.; YAUN, S. S.; ADAMI, H. O.; BEESEON, L.; FOLSOM, A. R.; et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. **American Journal of Epidemiology**, v. 152, p. 514-527, 2000.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, v. 31, p. 31-44, 1998.

VASCONCELOS, A. B.; MENDONÇA, G. A. S.; SICHIER, R. Height, weight, weight change and risk of breast cancer in Rio de Janeiro, Brazil. **São Paulo Medical Journal**, v. 2, p. 62-66, 2001.

WAITZBERG, A. F. L.; BRENTANI, M. M. Nutrição e câncer de mama. In: WAITZBERG, D. L. **Dieta, Nutrição e Câncer**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004.

WAYNER, D. D. M.; BURTON, G. W.; INGOLD, K. U.; LOCKE, S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled per-oxidation. **FEBS letters**, v. 187, p. 33-37, 1985.

WILLETT, W. C. Diet and breast cancer. **Journal of Internal Medicine**, v. 249, p. 395-411, 2001.

WILLETT, W. C. Dietary fat intake and cancer risk: a controversial and instructive story. **Seminars in Cancer Biology**, v. 8, p. 245-253, 1998.

WOODS, S. E.; LUKING, R.; ATKINS, B.; ENGEL, A. Association of race and breast cancer stage. **Journal of the National Medical Association**, v. 98, p. 683-686, 2006.

WRIGHT, R. M.; MCMANAMAN, J. L.; REPINE, J. E. Alcohol induced breast cancer: a proposed mechanism. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 3, p. 348-354, 1999.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal**, v. 336, p. 1-17, 1998.

YEH, C. C.; HOU, M. F.; TSAI, S. M.; LIN, S. K.; HSIAO, J. K.; HUANG, J. C.; et al. Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 361, p. 104-111, 2005.

ZHENG, W.; GUSTAFSON, D. R.; SINHA, R.; CERTHAN, J. R.; MOORE, D.; HONG, C. P.; et al. Well-done meat intake and the risk of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, p. 1724-1729, 1998.

CAPÍTULO 3

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado na Maternidade Carmela Dutra (MCD), situada na região central do município de Florianópolis, no estado de Santa Catarina.

A MCD é uma entidade governamental, tendo como missão principal a assistência médica, o ensino, a extensão comunitária e a pesquisa, relacionada ao atendimento obstétrico, ginecológico e oncológico. Em Santa Catarina, é centro de referência do Sistema Único de Saúde (SUS), na área de assistência em Oncologia Ginecológica e atende mulheres dos municípios do estado e dos estados vizinhos.

3.2 CRITÉRIOS E PROCEDIMENTOS PARA SELEÇÃO DOS SUJEITOS

3.4.1 Critérios de inclusão

- Mulheres com câncer de mama ou com suspeita da doença, hospitalizadas na MCD para tratamento cirúrgico mamário, com a equipe coordenada pelo médico mastologista Carlos Gilberto Crippa, no período de outubro de 2006 a julho de 2007.

3.4.2 Critérios de exclusão

- História prévia de câncer;
- Mulheres com diagnóstico de câncer de mama que realizaram qualquer tratamento prévio para a doença: cirurgia mamária, quimioterapia, radioterapia, uso de tamoxifeno;
- Mulheres com tumores benignos confirmados sem suspeita de malignidade;
- Mulheres com câncer de mama com idade acima de 60 anos;
- Gestantes;
- Nutrizes.

3.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população do estudo foi selecionada no período de outubro de 2006 a julho de 2007, entre as mulheres que eram admitidas para realizar cirurgia mamária pela equipe de Mastologia, coordenada pelo médico mastologista Carlos Gilberto Crippa. Neste período, 154 mulheres realizaram cirurgia mamária pelo SUS com esta equipe, das quais 106 (69%) foram excluídas do estudo por diversas razões: 42 (27%) com câncer de mama que haviam realizado tratamento prévio para a doença, 49 (32%) com tumores benignos confirmados por punção aspirativa por agulha fina (PAAF), 4 (3%) com história prévia de câncer e 11 (7%) com idade superior a 60 anos. Foram elegíveis 48 mulheres com câncer de mama ou com suspeita da doença das quais 1 (2%) recusou participar e 7 (15%) foram excluídas após a entrevista, pois tiveram diagnóstico benigno de doença mamária através do exame Anátomo Patológico. Finalmente, 40 mulheres com câncer de mama participaram do estudo, representando um taxa de resposta de 83% das mulheres elegíveis.

3.4 CRITÉRIOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisas com seres humanos (CEPSH), da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo 145/06) e pelo Comitê de Ética da Maternidade Carmela Dutra.

As mulheres elegíveis foram convidadas a participar do estudo sem qualquer constrangimento e mediante aceitação voluntária, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), segundo resolução do Conselho Nacional de Saúde, n. 196, de 10 de outubro de 1996 (CNS, 1996).

3.5 INSTRUMENTOS E TÉCNICAS DE COLETAS DE DADOS

3.5.1 Questionário sócio-demográfico, reprodutivo, clínico e antropométrico

A fim de satisfazer os objetivos do estudo, aplicou-se, por meio de entrevista, um questionário contendo informações sobre variáveis sócio-demográficas, reprodutivas, clínicas e antropométricas (APÊNDICE B). O questionário foi adaptado do estudo caso-controle de Di Pietro e colaboradores (2007).

O peso e a altura das mulheres foram aferidos de acordo com os padrões estabelecidos por Jelliffe e Jelliffe (1989). Para a aferição do peso e da altura, utilizou-se balança antropométrica da marca Filizola[®]. As medidas de peso e estatura foram utilizadas para o cálculo de IMC, onde o peso expresso em quilogramas (kg) é dividido pela estatura ao quadrado em metros. Para a classificação do estado nutricional, usou-se, como parâmetro, a classificação da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2000) (Quadro 3).

Quadro 3 - Pontos de corte do Índice de Massa Corporal (WHO, 2000).

Classificação	IMC (kg/m²)
Baixo Peso	< 18,5
Peso normal	≥ 18,5 – < 25
Sobrepeso	≥ 25 – < 30
Obesidade	≥ 30

A definição do estadiamento e a classificação do câncer de mama foram realizadas de acordo com o sistema Tumor (T), Nodo (N) e Metástase (M) (BRASIL, 2004).

3.5.2 Questionário de Frequência Alimentar

Para a obtenção dos dados sobre o consumo alimentar, aplicou-se um questionário de frequência alimentar (QFA) qualitativo e quantitativo, com coleta dos dados de forma retrospectiva, referente ao consumo do ano precedente. O QFA tem sido o melhor método de avaliação dietética pois permite obter dados retrospectivos por períodos mais longos e classificar os indivíduos em níveis de ingestão de alimentos para análise de risco segundo o grau de exposição (WILLETT, 1998).

Com o intuito de satisfazer os propósitos do estudo e coletar dados de consumo mais próximos da realidade da população investigada, utilizou-se um QFA adaptado do QFA validado por Sichieri e Everhart (1998) (APÊNDICE C).

Alguns alimentos e preparações constantes no QFA de Sichieri e Everhardt foram renomeados de acordo com a forma de preparo e/ou composição tais como: bife foi substituído por bife com gordura ou frito e bife magro ou assado/grelhado; carne de porco, por carne de porco com gordura ou frita e carne de porco magra ou assada; frango, por frango com gordura/pele ou frito e frango magro ou assado; peixe fresco, por peixe fresco

com gordura ou frito/à milanesa e peixe fresco magro ou assado; leite, por leite integral e leite desnatado, queijo por queijo amarelo e queijo branco; e manteiga ou margarina, por manteiga e margarina.

Posteriormente às adaptações realizadas, foi feito um pré-teste, no mês de outubro de 2006, no qual entrevistou-se dez mulheres alheias à pesquisa, a fim de se analisar a estruturação do QFA. Este teste permitiu identificar os alimentos e preparações que não fazem parte do hábito da população alvo do estudo. A partir deste pré-teste foram excluídos do QFA os seguintes alimentos: pipoca, inhame ou cará, chicória, quiabo, chocolate em pó, mate, carnes ou peixes conservados em sal e alimentos enlatados. Além disso, alguns alimentos não constantes no QFA original, referidos no pré-teste, foram adicionados ao QFA. São eles: cereais matinais, chimarrão, banha de porco, nata, caqui, kiwi, morango, óleo vegetal (todos os tipos), oleaginosas, mel, geléias, suco artificial e chá.

A realização do pré-teste permitiu adaptar o instrumento à população estudada, além de se observar a maneira mais adequada de abordagem do paciente para uma melhor obtenção dos dados. O QFA adaptado final apresentou 94 alimentos.

Para auxiliar os entrevistados na identificação das porções consumidas utilizou-se um registro fotográfico para inquéritos dietéticos (ZABOTTO, 1996) e utensílios domésticos de vários tamanhos freqüentemente usados como medidas (pratos, copos, xícaras e talheres).

3.5.3 Análise do consumo alimentar habitual

Os dados obtidos do QFA foram utilizados para determinar quantitativamente o consumo alimentar habitual da seguinte forma: primeiramente, as freqüências de consumo (mais de 3 vezes por dia; de 2 a 3 vezes por dia; 1 vez por dia; 5 a 6 vezes por semana; 2 a 4 vezes por semana; 1 vez por semana; 1 a 3 vezes por mês; nunca ou quase nunca) foram transformadas em freqüências diárias. Desta forma, três vezes por mês foi transformada em 0,1 ($3 \div 30 = 0,1$) e, assim sucessivamente. Foi utilizado a média do intervalo de freqüência de forma que duas a quatro vezes por semana foi transformado em $3/7$ ($3 \div 7$), conforme realizado por Sichieri e Everhardt (1998) no estudo de validação. Em seguida, as freqüências diárias foram multiplicadas pelas quantidades em gramas ou mililitros dos alimentos e, finalmente, as quantidades diárias de cada alimento foram transformadas no número de porções de seu respectivo grupo alimentar.

Foram calculadas a quantidade em gramas e o número de porções correspondentes de todos os alimentos do QFA, os quais foram classificados de acordo com os oito grupos alimentares que compõem o Guia Alimentar para a população Brasileira (BRASIL, 2006): cereais, tubérculos e raízes; verduras e legumes; frutas; leguminosas; leites e derivados; carnes e ovos; óleos e gorduras; açúcares e doces. Para verificar a existência de associação entre consumo de alimentos mais específicos e o estresse oxidativo foram criados subgrupos de alimentos a partir dos oito grupos alimentares que compõem o guia: cereais de pastelaria; verduras crucíferas; verduras ricas em carotenóides; frutas ricas em vitamina C; frutas ricas em carotenóides; laticínios ricos em gordura; laticínios pobres em gordura; carnes vermelhas; peixes; aves; carnes processadas; carnes gordurosas; carnes magras; gorduras de origem vegetal e gorduras de origem animal. A quantidade em mililitros de bebidas com e sem teor alcoólico, que não estão incluídas nos grupos do Guia Alimentar, foram também obtidas. Os alimentos considerados em cada subgrupo alimentar estão descritos no APÊNDICE D.

Os cálculos foram realizados através de um programa desenvolvido no *software* Microsoft Excel. O cálculo do número de porções dos grupos alimentares foi baseado na quantidade em gramas de cada alimento que é necessária para fornecer o conteúdo energético equivalente a uma porção, de acordo com o Guia Alimentar para a população Brasileira (BRASIL, 2006). Assim, por exemplo, 50g de pão francês ou 125g de arroz branco cozido fornecem 150Kcal e equivalem a uma porção do grupo dos cereais, tubérculos e raízes. Os alimentos não listados como exemplo de porções no Guia alimentar tiveram as quantidades em gramas, necessárias para fornecer o valor energético de uma porção do seu grupo alimentar, determinadas pela tabela de pesos e medidas de Pinheiro e colaboradores (2005).

Os alimentos sazonais, tais como as frutas e verduras, tiveram suas estimativas de consumo diário obtidas considerando-se o período da safra. Para este cálculo, primeiramente, a frequência de consumo relatada foi transformada em frequência diária durante o período de safra do produto. Em seguida, o resultado obtido foi multiplicado pelo resultado da divisão entre o número de dias do período da safra e o número de dias do ano e, finalmente, este foi multiplicado pela quantidade dos alimentos em gramas e/ou mililitros, para que, assim, as quantidades diárias fossem transformadas em número de porções de frutas e verduras. Para esse cálculo, utilizou-se a tabela de safra da secretaria de

agricultura e abastecimento do estado de São Paulo (ANEXO C). O consumo diário de sorvete também foi estimado, considerando-se apenas o verão.

A conversão das medidas caseiras em gramas e mililitros das frutas, bolinho de padaria, banha de porco, nata e chimarrão foi obtida pela avaliação das medidas de volume e pesagens, através da técnica descrita por Griswold (1972), no Laboratório de Técnica Dietética da Universidade Federal de Santa Catarina. Para a polenta foi utilizada a tabela de Ben (2007) e para o restante dos alimentos, a tabela de pesos e medidas de alimentos de Pinheiro e colaboradores (2005).

Para a análise da adequação do consumo das porções diárias, calculou-se inicialmente o requerimento energético estimado (REE) de cada participante de acordo com a fórmula abaixo (INSTITUTE OF MEDICINE, 2002):

$$\text{REE} = 354 - 6,91 \times \text{idade (anos)} + \text{Fator Atividade} \times (9,36 \times \text{peso [kg]} + 726 \times \text{altura [m]})$$

Onde:

Fator Atividade = 1.0 se sedentário; 1.12 se pouco ativo; 1.27 se ativo e; 1.45 se muito ativo.

Posteriormente, a partir do número de porções diárias de cada grupo recomendadas para o parâmetro exemplificador de 2000 Kcal do Guia Alimentar foram obtidos o número de porções diárias recomendadas para cada participante de acordo com suas necessidades nutricionais.

A avaliação da adequação do consumo foi realizada individualmente, comparando-se o consumo diário de porções obtidas pelo QFA com as porções diárias recomendadas conforme as necessidades nutricionais.

3.5.4 Avaliação Bioquímica

O estado de estresse oxidativo foi avaliado a partir da determinação da concentração de glutathiona reduzida eritrocitária, capacidade antioxidante total sérica, peroxidação lipídica plasmática, hidroperóxidos lipídicos plasmáticos e oxidação protéica plasmática.

As amostras sanguíneas de todas as participantes foram coletadas através de punção da veia intermédia do antebraço, por um profissional da área da enfermagem. As amostras foram armazenadas, inicialmente, em dois tipos de tubos: tubos com separador de soro (soro gel), para determinação da concentração de antioxidantes totais séricos e tubos

contendo solução anticoagulante (EDTA = ácido etileno diaminoacético) para determinação das demais análises de interesse. Todos os tubos foram devidamente identificados com códigos numéricos. Em seguida, as amostras foram transportadas em recipiente térmico com gelo até o Laboratório de Pesquisa Lipídeos Antioxidantes e Aterosclerose da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foi realizado o preparo das amostras para posterior análise do estado de estresse oxidativo. Primeiramente, reservou-se, em extrato ácido, uma alíquota do sangue coletado no tubo com EDTA (ver preparo do extrato ácido abaixo). Em seguida, para obtenção do soro e do plasma, o sangue coletado nos tubos com soro gel e com EDTA, respectivamente, foram centrifugados a 1000 x g por 10 min. Após a centrifugação, foram preparadas alíquotas de amostras de soro e plasma, em tubo criogênico, devidamente identificados com os códigos de cada paciente e, em seguida, foram armazenados em nitrogênio líquido (-170° C). O período máximo entre a coleta sangüínea e a análise dos parâmetros de interesse, para manutenção da estabilidade das amostras, foi padronizado de acordo com o observado por Firuzi e colaboradores (2006). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Preparo do extrato ácido: Após a coleta do sangue com EDTA, transferiu-se para tubos tipo Eppendorf, 300 µL de sangue e 300 µL de água deionizada gelada, agitou-se em agitador tipo vortex e deixou-se em repouso, no gelo, por 10min. Após este período, foram adicionados 150 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20%, agitado novamente e centrifugado 12000 x g, a 4° C por 10 min. O sobrenadante límpido foi acondicionado em tubo criogênico, armazenado em nitrogênio líquido para a reação nas análises de glutathiona reduzida (GSH).

A glutathiona reduzida (GSH) foi determinada a partir da alíquota reservada em extrato ácido, através do método proposto por Beutler e colaboradores (1963). A adição de 50 µL de ácido 2,3-ditionitrobenzóico 10 mM (DTNB) em tubos contendo 800 µL de Tampão fosfato 0,2 M e 50 µL da amostra, permite, após cerca de 3 minutos, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, de absorvância máxima em 412 nanômetros (nm). O branco foi preparado substituindo o extrato ácido por água deionizada.

A concentração de GSH (µmol/L) foi calculada, utilizando-se a equação da reta com os valores da concentração e da absorvância da curva-padrão preparada com diferentes concentrações de GSH (Sigma-Aldrich, St Louis – EUA) através da fórmula:

$$\text{GSH } (\mu\text{mol/L}) = \text{Abs}_{\text{amostra}} - a / b$$

O resultado final foi multiplicado pelo fator de diluição (2,5) durante o procedimento de obtenção do extrato ácido.

A capacidade antioxidante total sérica foi determinada através do potencial antioxidante redutor férrico (FRAP – do inglês, *ferric reducing antioxidant potential*), de acordo com a técnica descrita por Benzie e Strain (1996). Neste ensaio, os antioxidantes presentes no soro foram avaliados como redutores do Fe^{+3} a Fe^{+2} , o qual é quelado pela 2,4,6-tri (2-pyridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe^{+2} -TPTZ com absorvância máxima em 593 nm. Dez microlitros de plasma foram misturados a 1 mL de reagente de trabalho (FeCl_3 1,7 mM, preparado em acetato de sódio 300 mM, pH 3,6 e TPTZ 0,8 mM preparado em ácido clorídrico (HCl) 40 mM). As amostras foram incubadas por 15 minutos a 37° C e, posteriormente, a absorvância foi lida em 593 nm contra o branco da reação (apenas reagente de trabalho). A capacidade antioxidante total, expressa em equivalentes de trolox (Eq trolox), foi calculada, utilizando-se a equação da reta com os valores da concentração e da absorvância da curva-padrão, preparada com diferentes concentrações de trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E, através da fórmula:

$$\text{Capacidade antioxidante total } (\mu\text{M Eq trolox}) = \text{Abs}_{\text{amostra}} - a / b$$

A peroxidação lipídica plasmática foi determinada através da detecção dos derivados dos produtos de oxidação, substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), destacando-se o malondialdeído (MDA), de acordo com o método descrito previamente por Esterbauer e Cheeseman (1990). A técnica se baseia na reação de uma molécula de MDA, um produto da peroxidação lipídica, com duas moléculas de TBA, resultando na eliminação de duas moléculas de água e a formação de um pigmento rosa. Aliquotas de 250 μL de amostra foram misturadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% em HCl 0,5 N e com 50 μL de butil hidroxitolueno (BHT) 10 mM. Adicionou-se TBA 1% (0,5 mL) e incubou-se a mistura a 100°C em banho-maria por 1 hora. Após resfriamento em água com gelo, adicionou-se 2,5 mL de butanol e os tubos foram agitados em agitador tipo vortex por 30 segundos. Em seguida os tubos foram centrifugados a 1000 x g por 5 minutos. A absorvância do sobrenadante foi determinada em 532 nm, acertando-se o zero do espectrofotômetro com o branco da reação. Para o branco, a amostra foi substituída por água deionizada.

A concentração de TBARS ($\mu\text{mol/L}$) foi calculada, utilizando-se a equação da reta com os valores da concentração e da absorbância da curva-padrão preparada com diferentes concentrações de 1,1,3,3-tetramethoxypropano (TMP), através da fórmula:

$$\text{TBARS } (\mu\text{mol/L}) = \text{Abs}_{\text{amostra}} - a / b$$

Os hidroperóxidos lipídicos presentes no plasma foram determinados pelo método da oxidação do ferro com alaranjado de xilenol (FOX – do inglês, Fe^{+3} xylenol orange), conforme descrito por Jiang e colaboradores (1992).

O princípio do método se baseia na rápida oxidação do Fe^{+2} a Fe^{+3} em meio ácido, mediada pelos peróxidos lipídicos. O Fe^{+3} , na presença de alaranjado de xilenol, forma um complexo (Fe^{+3} -alaranjado de xilenol) que é quantificado espectrofotometricamente em 560 nm. Alíquotas de 130 μL de plasma foram misturadas com 20 μL de trifetilfosfina (TEP) 20 mM em tubos tipo Eppendorf. Os tubos foram agitados em agitador tipo vortex e mantidos em temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. A cada 10 minutos os tubos foram agitados em agitador tipo vortex. Após este período, 1,4 mL de reagente de trabalho FOX, contendo alaranjado de xilenol 1 mM e sulfato de ferro e amônio 2,5 mM, preparados em H_2SO_4 250 mM e BHT 4,4 mM preparado em metanol, foi adicionado aos tubos, agitados em vortex e novamente mantidos em temperatura ambiente, no escuro, por 60 min. A cada 10 min os tubos foram agitados em agitador tipo vortex. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 16000 x g por 10 min e a absorbância foi lida em 560 nm contra um branco de água. Os brancos foram preparados, substituindo-se a trifetilfosfina (TEP) 20 mM por metanol grau HPLC.

A concentração de hidroperóxidos lipídicos ($\mu\text{mol/L}$) foi calculada, utilizando-se a equação da reta com os valores da concentração e da absorbância da curva-padrão, preparada com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e da diferença entre as absorbâncias das amostras tratadas com metanol (branco) e das amostras tratadas com TEP através da fórmula:

$$\text{Hidroperóxidos lipídicos } (\mu\text{mol/L}) = \Delta - a / b$$

$$\text{Onde } \Delta = \text{Abs}_{\text{branco}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}$$

A determinação das proteínas modificadas oxidativamente foi realizada através do método das carbonilas, proposto por Levine e colaboradores (1990). O método consiste na reação da 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as carbonilas das proteínas, formando hidrazonas que podem ser detectadas espectrofotometricamente. É uma técnica com alta

reprodutibilidade, podendo detectar níveis de carbonilas em vários sistemas. Alíquotas de 100µL de plasma foram misturadas a 600µL de DNPH 10 mM em tubos tipo Eppendorf. Os tubos foram inicialmente agitados em vortex e, em seguida, mantidos em temperatura ambiente, no escuro, por 60 min. Durante este período, os tubos foram novamente agitados em vortex a cada 10 min. Após, 600µL de TCA 20% foi adicionado aos tubos, agitados em vortex e novamente mantidos em temperatura ambiente, no escuro, por 10 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 11000 x g por 5 min a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (“pellet”), então, foi lavado três vezes com 800 µL de etanol-acetato de etila (1:1). Entre cada lavada, os tubos foram incubados por 10 min à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugados a 15000 x g por 5 min a 4° C. Após a última centrifugação, foram adicionados 900µL de guanidina 6,0 M, preparada em KH₂PO₄ 20 mM, ao “pellet” e incubados em banho-maria a 37°C, por 60 min, sob agitação contínua. Depois deste período de incubação, os tubos foram centrifugados a 15000 x g por 10 min a 4°C e a absorbância foi lida em 360 nm, utilizando-se solução de guanidina 6,0 M para zerar o espectrofotômetro. Os brancos foram preparados, substituindo-se a DNPH por ácido clorídrico (HCl) 2 M.

Para a determinação da quantidade de proteína totais, os brancos (100 µL) foram diluídos em 900 µL de solução de guanidina 6,0 M (1:9 g/v) e então lidos em 280 nm. A concentração de proteínas totais (mg/L) foi calculada, utilizando-se a equação da reta com os valores da concentração e da absorbância em 280 nm da curva-padrão, preparada com diferentes concentrações de albumina bovina sérica através da fórmula:

$$\text{Proteínas totais (mg/L)} = \text{Abs}_{\text{branco}} - a / b \times 10 \times 1000$$

$$10 = \text{fator de diluição 1:9 g/v}$$

$$1000 = \text{fator de conversão de mL para L}$$

A concentração de proteínas carboniladas foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 22 mM, sendo expressa em nanomol (nmol) por miligrama de proteína conforme a fórmula:

$$\text{Proteína Carbonilada (nmol/mg)} = [(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) / 22000] / [\text{Proteínas totais (mg/L)}]$$

3.6 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

As informações coletadas foram transcritas para um banco de dados, com dupla entrada, no software Excel. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Stata 9.0 (STATA, 2005).

A estatística descritiva foi apresentada na forma de média, desvio-padrão, mediana, valor mínimo e valor máximo para as variáveis quantitativas, e frequência absoluta para as variáveis categóricas.

O teste *Shapiro-wilk* foi aplicado para testar a normalidade das variáveis contínuas. As variáveis contínuas com distribuição normal foram comparadas pelo *teste t*, enquanto que as variáveis contínuas com distribuição não-paramétrica foram avaliadas pelo teste de *Mann-Whitney U*. O teste qui-quadrado ou teste exato de *Fisher* foi aplicado às variáveis categóricas.

Para análise da relação entre consumo alimentar e estresse oxidativo, as variáveis foram categorizadas em percentis (Percentil ≤ 50 , Percentil > 50). Fatores associados com concentrações de TBARS, hidroperóxidos lipídicos, proteínas carboniladas e glutatona reduzida maior do que Percentil 50 e concentrações da Capacidade Antioxidante total menor ou igual ao Percentil 50 foram analisadas usando modelo de regressão logística. Análise univariada foi realizada, e a Odds Ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foram usados para quantificar a associação entre fatores de risco e percentis bioquímicos.

No modelo de regressão logística, o consumo diário dos grupos e subgrupos alimentares foi analisado para cada 10 ou 100 gramas ou mililitros ingeridos acima do Percentil 50. Estas unidades foram escolhidas para detectar pequenas modificações na OR.

Todas as variáveis que apresentarem $p < 0,25$ na análise de regressão logística univariada serão selecionadas para análise de regressão multivariada. Variáveis que apresentaram colinearidade ou baixa frequência foram excluídas do modelo multivariado, enquanto que variáveis com mais de duas categorias foram transformadas em variáveis “dummy”. O teste da razão de máxima verossimilhança foi aplicado para definir o modelo final multivariado.

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEN, M. L. **Quanto pesa?: tabela de pesos e medidas de alimentos**. Porto Alegre: Ediplat; 2007.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (frap) as a measure of antioxidant power: the frap assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-90, 1963.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Atenção Básica. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Guia Alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **TNM: classificação de tumores malignos**. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Resolução nº 196, de 10 de Outubro de 1996: aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 out. 1996.

DI PIETRO, P. F.; MEDEIROS, N. I.; VIEIRA, F. G. K.; FAUSTO, M. A.; BELLÓ-KLEIN, A. Breast cancer in southern Brazil: association with past dietary intake. **Nutrición Hospitalaria**, v. 22, p. 565-72, 2007.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FIRUZI, O.; MLADENKA, P.; RICCIERI, V.; SPADARO, A.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; et al. Parameters of oxidative stress status in healthy subjects: their correlations and stability after sample collection. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 20, p. 139-148, 2006.

GRISWOLD, R. M. **Estudo Experimental dos Alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 1972.

INSTITUTE OF MEDICINE. Food and Nutrition Board. **Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients)**. Washington: National Academy Press, 2002. Disponível em: <http://www.nap.edu/> Acesso em: setembro de 2007.

JELLIFFE, J. D.; JELLIFFE, E. F. P. **Community nutritional assessment with especial reference to less technically developed countries**. 2ed. London: Oxford University press, 1989.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. J.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, p. 384-389, 1992.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

PINHEIRO, A. B. V.; LACERDA, E. M. A.; BENZECRY, E. H.; GOMES, M. C. S.; COSTA, V. M. **Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras**. 5 ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005.

SECRETARIA DE AGRICULTURA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Tabela de safra**. Disponível em: <http://www.agroportal.sp.gov.br> Acesso em: setembro de 2007.

SICHERI, R.; EVERHART, M. D. Validity of a brazilian frequency questionnaire against dietary recalls and estimated energy intake. **Nutrition Research**, v. 19, p. 1649-1659, 1998.

STATA STATISTICS SOFTWARE: Release 9.0. **Stata Statistics Software**. College Station: Stata Corporation; 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on obesity. Geneva: WHO; 2000.

ZABOTTO, C. B. **Registro fotográfico para inquéritos dietéticos**. Campinas: Unicamp, 1996.

CAPÍTULO 4

PERFIL SÓCIO-DEMOGRÁFICO, REPRODUTIVO, CLÍNICO E NUTRICIONAL DE MULHERES COM CÂNCER DE MAMA

Artigo formatado de acordo com as normas da Revista Archivos Latinoamericanos de Nutrición (Qualis B Internacional) (ANEXO D)

Perfil sócio-demográfico, reprodutivo, clínico e nutricional de mulheres com câncer de mama

Nutritional, clinical, reproductive and demographic-social profile of breast cancer women

Endereço para correspondência: Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Universitário. Trindade, Cep 880109970. Florianópolis/SC - Brasil. Fone: (048) 3721 8014. Fax: (048) 3721 9542. Correspondência para/correspondence to: Patrícia Faria Di Pietro. E-mail: fariadipietro@gmail.com

Este projeto recebeu apoio financeiro do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e da Pró-Reitoria de Cultura e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina

Perfil de mulheres com câncer de mama

Profile of breast cancer women

Resumo

Este estudo teve como objetivo descrever o perfil sócio-demográfico, reprodutivo, clínico e nutricional de mulheres com câncer de mama, atendidas na Maternidade Carmela Dutra, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Todos os dados foram coletados a partir de um inquérito padronizado e de um questionário de frequência alimentar validado. Quarenta mulheres entre 30 e 60 anos, idade média de $48 \pm 7,43$ anos foram selecionadas para o estudo. Entre os fatores que apresentam forte associação com o câncer de mama, foram encontradas prevalências de 40% para menarca até os 12 anos, 87,5% para uso prolongado de contraceptivos orais, 27,5% para terapia de reposição hormonal e 35% para antecedente familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau. Para outros fatores investigados, as prevalências foram mais elevadas em história de abortos (38%), tabagismo (50%), sedentarismo (75%), peso excessivo (70%), elevado consumo de óleos e gorduras, (90%), elevado consumo de carnes e ovos (85%), baixo consumo de verduras e legumes (92,5%) e baixo consumo de frutas (47,5%). Conhecer a prevalência das variáveis associadas ao câncer de mama pode ser de grande importância para a saúde pública no que diz respeito à adoção de programas de intervenção para o controle desta neoplasia.

Palavras-chave: neoplasias mamárias, fatores de risco, mulheres

Abstract

The objective of this work was to describe the nutritional, clinical, reproductive and demographic-social profile of women with breast cancer from Carmela Dutra Maternity, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. All the data were collected with a standardized protocol and a validated food frequency questionnaire. A total of 40 women aged 30-60 years were included in the study. Among the factors associated with breast cancer, 40% had menarche before 12 years old, 87.5% had a prolonged use of oral contraceptives, 27.5% were on hormonal replacement therapy and 35% had a first-degree family history of breast cancer. The prevalence of other factors was higher in women with a history of abortion (38%), smoking (50%), low physical activity (75%), overweight (70%), high oils and fats intake (90%), high meat and eggs intake (85%), low vegetables intake (92.5%) and low fruits intake (47.5%). To know the prevalence of variables associated with breast cancer can be very important to public health in adoption of intervention programs for control of this neoplasm.

Key words: breast neoplasms, risk factors, women

Introdução

Em 2008, são esperados no Brasil 49400 novos casos de câncer de mama, com uma taxa bruta de incidência de 51:100 000 mulheres. Em Santa Catarina, estado da região Sul do país, a estimativa é de 52:100 000 mulheres, sendo que, para Florianópolis, capital deste estado, a situação é ainda mais agravante, com um risco estimado de 62:100 000 mulheres (1).

O câncer de mama é uma doença considerada multifatorial, de causas endógenas e ambientais, em que a susceptibilidade genética do indivíduo interage com fatores ambientais, nutricionais e outros fatores de risco relacionados ao estilo de vida (2). Alguns fatores já estão estabelecidos na causalidade da doença, como idade avançada, história familiar e história pregressa de câncer de mama; menarca precoce; menopausa tardia; nuliparidade; primeira gestação após 30 anos; terapia de reposição hormonal; uso prolongado de contraceptivos orais e obesidade na pós-menopausa (3-8). Além desses, outros fatores também estão sendo investigados, apesar dos resultados dos estudos serem ainda controversos. São eles: sedentarismo; baixo consumo de frutas e verduras ricas em antioxidantes; elevado consumo de álcool, gorduras em geral e carnes gordurosas; história de abortos; ausência ou curto período do aleitamento materno ao longo da vida; tabagismo e exposição a toxinas ambientais (3, 9-14).

O conhecimento científico acumulado até o presente indica que cerca de 50% dos casos de câncer de mama podem ser explicados pelos fatores de risco descritos (2). Infelizmente, é evidente que os principais fatores de risco para o câncer de mama na mulher não são passíveis de intervenção em nível populacional. Entretanto, um pequeno número de fatores de risco tem sido alvo de estratégias para a prevenção primária e recidiva do câncer de mama, entre eles, obesidade, tabagismo, elevado consumo de gorduras, baixo consumo de frutas e verduras e sedentarismo (15, 16).

Com base no exposto, torna-se imprescindível conhecer o padrão de distribuição de fatores de risco associados ao câncer de mama em grupos que já desenvolveram a doença, com o intuito de posteriormente estabelecer estratégias de intervenção sobre os fatores de risco relacionados ao estilo de vida. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo descrever o perfil sócio-demográfico, reprodutivo, clínico e nutricional de uma amostra de casos novos de câncer de mama, atendidos no principal hospital maternidade da cidade de Florianópolis, Brasil.

População do estudo e métodos

O trabalho foi realizado na Maternidade Carmela Dutra (MCD), situada na região central do município de Florianópolis, no estado de Santa Catarina, Brasil. A população do estudo foi selecionada entre 154 mulheres admitidas para tratamento cirúrgico mamário, pelo Sistema Único de Saúde, com a equipe coordenada pelo médico mastologista Carlos Gilberto Crippa, no período entre outubro de 2006 e julho de 2007. Para evitar possíveis vícios na coleta de determinadas variáveis investigadas, 106 mulheres foram excluídas do estudo por diversos motivos: 42 (27%) com câncer de mama que haviam realizado tratamento prévio para a doença, 49 (32%) com tumores benignos confirmados sem suspeita de malignidade, quatro (3%) com história pessoal de câncer e 11 (7%) com idade superior a 60 anos. Foram elegíveis 48 mulheres com câncer de mama ou com suspeita da doença das quais uma (2%) recusou-se a participar e sete (15%) foram excluídas após a entrevista e procedimento cirúrgico, pois tiveram diagnóstico de doença mamária benigna através do exame anátomo patológico. Finalmente, 40 mulheres com câncer de mama, com idade compreendida entre 30 e 60 anos, participaram do estudo, representando um taxa de resposta de 83% das mulheres elegíveis.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisas com seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo 145/06) e pelo Comitê de Ética da MCD.

Todas as participantes foram entrevistadas, após a admissão e antes do procedimento cirúrgico, por um único investigador, utilizando-se um questionário, adaptado do estudo de Di Pietro et al (10). Foram coletados dados referentes à idade, raça, estado civil, procedência, profissão, escolaridade, renda per capita, idade à menarca, número de gestações, paridade, idade da 1ª gestação, aleitamento materno ao longo da vida, uso de contraceptivos hormonais orais, terapia de reposição hormonal, idade à menopausa, doenças associadas, história familiar para câncer e câncer de mama, consumo de álcool, tabagismo e prática de atividade física. A definição do estadiamento e a classificação do câncer de mama foram realizadas de acordo com o sistema Tumor (T), Nodo (N) e Metástase (M) (17).

O peso e a altura foram aferidos através de procedimentos padrões (18) em balança antropométrica da marca Filizola®. O estado nutricional foi avaliado através do índice de

massa corporal (IMC) e utilizou-se, como parâmetro, a classificação da Organização Mundial da Saúde (19).

Os dados sobre o consumo alimentar foram obtidos através de um questionário de frequência alimentar (QFA), adaptado do QFA validado por Sichieri e Everhart (20), com 94 alimentos, referente ao consumo do ano precedente. Para auxiliar os entrevistados na identificação das porções consumidas, foi utilizado um registro fotográfico para inquéritos dietéticos (21) e utensílios domésticos de vários tamanhos, freqüentemente usados como medidas. A conversão das medidas caseiras em gramas e mililitros das frutas, bolinho de padaria, banha de porco, nata e chimarrão foi obtida pela avaliação das medidas de volume e pesagens através da técnica descrita por Griswold (22), no Laboratório de Técnica Dietética da Universidade Federal de Santa Catarina. Para a polenta foi utilizada a tabela de Ben (23) e para o restante dos alimentos, utilizou-se a tabela de pesos e medidas de alimentos de Pinheiro et al (24).

O consumo alimentar habitual foi analisado, quantitativamente, através do cálculo do número de porções dos oito grupos alimentares que compõem o Guia Alimentar para a população Brasileira (25), de acordo com a quantidade em gramas de cada alimento que é necessária para fornecer o conteúdo energético equivalente a uma porção. Alimentos sazonais, tais como as frutas e verduras, tiveram suas estimativas de consumo diário obtidas considerando-se o período de safra (26).

Para a análise da adequação do consumo das porções diárias, calculou-se inicialmente o requerimento energético estimado (REE) de cada participante (27). Em seguida, a partir do número de porções diárias de cada grupo recomendadas para o parâmetro exemplificador de 2000 Kcal do Guia Alimentar (25) foram obtidos o número de porções diárias recomendadas para cada participante de acordo com suas necessidades nutricionais. A avaliação da adequação do consumo foi realizada individualmente, comparando-se o consumo diário de porções obtidas pelo QFA com as porções diárias recomendadas conforme as necessidades nutricionais.

As informações coletadas foram transcritas para um banco de dados, com dupla entrada, no software Excel. Foi realizada análise estatística descritiva, no software Stata 9.0, através de média e desvio-padrão para as variáveis quantitativas, e frequência absoluta para as variáveis categóricas.

Resultados

Na análise das mulheres, 95% (38) eram brancas e 5% (2) eram pardas. A média de idade foi de $48 \pm 7,43$ anos, sendo que houve maior concentração na faixa dos 41 aos 60 anos com 85% (34). Os níveis de escolaridade variaram, sendo que 2,5% (1) nunca foram à escola, 45% (18) freqüentaram a escola por até quatro anos, 20% (8) estudaram entre cinco a oito anos e 32,5% (13) estudaram mais de oito anos. A maioria das mulheres (67,5%) estava casada e 55% (22) moravam na região da Grande Florianópolis. Quanto à situação atual de trabalho, 27,5% (11) exerciam atividades somente em casa, sem vínculo empregatício, 27,5% (11) atuavam como empregada doméstica, 27,5% (11) eram comerciantes, 12,5% (5) eram agricultoras e 5% (2) atuavam como pedagogas. A maioria (55%) referiu renda mensal *per capita* abaixo de um salário mínimo (SM) (R\$380,00 SM vigente em janeiro de 2008) (dados não demonstrados em tabelas).

Na tabela 1 está apresentada a distribuição de freqüências de variáveis reprodutivas e antecedentes familiares de câncer e câncer de mama da população estudada.

Inserir tabela 1

Entre as mulheres que engravidaram (37), 74% de todas as gestações evoluíram a termo, sendo observada uma média de 2,5 filhos por mulher, tendo 38% (14) história de aborto. As mulheres que amamentaram (84%) apresentaram uma duração média do aleitamento materno ao longo da vida de 18 meses. Das 18 mulheres que haviam alcançado a menopausa (45%), 27,8% (5) realizaram terapia de reposição hormonal. Cerca de 82% dos familiares acometidos por cânceres eram parentes de primeiro grau das entrevistadas (dados não demonstrados em tabelas).

O consumo de álcool foi relatado por 12,5% (5) das mulheres. Das 20 (50%) mulheres que referiram o hábito de fumar, oito (40%) eram ex-fumantes e 16 (80%) fumaram por mais de dez anos. Setenta e cinco por cento das entrevistadas eram sedentárias (dados não demonstrados em tabelas).

A distribuição da prevalência das variáveis clínicas da população estudada está apresentada na tabela 2.

Inserir tabela 2

Tabela 1 Distribuição de variáveis reprodutivas, hormonais e história familiar de câncer e câncer de mama de mulheres com câncer de mama admitidas para cirurgia na Maternidade Carmela Dutra, Florianópolis, SC.

Variável	N	%
Número de gestações		
0	3	7,5
1 – 3	25	62,5
≥ 4	12	30
Total	40	100
Paridade		
1 – 3 filhos	30	81
≥ 4 filhos	7	19
Total	37	100
Idade da 1ª gestação		
< 20	7	19
20 – 30	25	67,5
≥ 30	5	13,5
Total	37	100
Idade à menarca		
≤ 12	16	40
13 – 15	16	40
> 15	8	20
Total	40	100
Idade à menopausa		
Pré-menopausa	22	55
< 50	8	20
≥ 50	10	25
Total	40	100
Tempo de uso de Contraceptivos hormonais orais (anos)		
Não usou	5	12,5
≤ 5	14	35
6 – 10	9	22,5
≥ 10	12	30
Total	40	100
História familiar de câncer		
Sim	28	70
Não	12	30
Total	40	100
História familiar de câncer de mama		
Sim	17	42,5
Não	23	57,5
Total	40	100

Tabela 2 Distribuição de variáveis clínicas de mulheres com câncer de mama admitidas para cirurgia na Maternidade Carmela Dutra, Florianópolis, SC.

Variável clínica	N	%
Doenças associadas		
Nenhuma	28	70
Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)	6	15
HAS e Doença cardiovascular	3	7,5
Hiperlipidemia	1	2,5
HAS e Hipotireoidismo	1	2,5
HAS, Diabetes e Hipotireoidismo	1	2,5
Total	40	100
Classificação do tumor		
Carcinoma infiltrante	37	92,5
Carcinoma in situ	3	7,5
Total	40	100
Estadiamento do tumor		
0	3	7,5
I	15	37,5
II	13	32,5
III	9	22,5
Total	40	100

Em relação ao estado nutricional, constatou-se que a média do IMC foi de $27,5 \pm 4,7\text{Kg/m}^2$, com maior frequência de sobrepeso (15: 37,5%) e obesidade (13: 32,5%) (Figura 1).

Inserir figura 1.

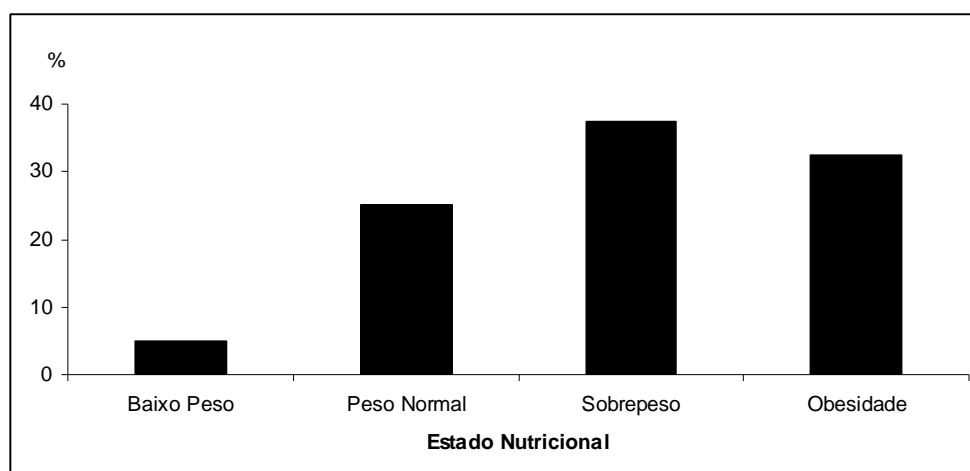


Figura 1 - Distribuição de mulheres com câncer de mama admitidas para cirurgia na Maternidade Carmela Dutra, Florianópolis, SC de acordo com o estado nutricional.

Em relação ao consumo alimentar observou-se que cerca de 90% (36) e 85% (34) das mulheres, respectivamente, apresentaram consumo de óleos e gorduras e de carnes e ovos acima do número de porções recomendadas pelo guia alimentar de acordo com as necessidades nutricionais de cada participante. Em contrapartida, 92,5% (37) consumiam diariamente porções de verduras e legumes abaixo do número de porções recomendadas. A maioria também apresentou consumo de porções dos grupos do leites e derivados (72,5%), cereais (65%), leguminosas (60%) e frutas (47,5%) abaixo do número de porções recomendadas (Tabela 3).

Inserir Tabela 3

Tabela 3 Distribuição de mulheres com câncer de mama admitidas para cirurgia na Maternidade Carmela Dutra, Florianópolis, SC, de acordo com a adequação do consumo de porções dos grupos alimentares.

Grupo Alimentar	Abaixo		Adequado		Acima	
	N	%	N	%	N	%
Cereais, tubérculos e raízes	26	65	4	10	10	25
Verduras e legumes	37	92,5	3	7,5	0	0
Frutas	19	47,5	7	17,5	14	35
Leguminosas	24	60	6	15	10	25
Leites e derivados	29	72,5	3	7,5	8	20
Carnes e ovos	4	10	2	5,0	34	85
Óleos e gorduras	1	2,5	3	7,5	36	90
Açúcares e doces	17	42,5	6	15	17	42,5

Discussão

Apesar dos critérios estabelecidos para a seleção das participantes do estudo, há a possibilidade de ocorrência de possíveis vícios quanto à percepção de seu estado de saúde e condicionantes, acarretada pelo fato de os indivíduos participantes, estarem sobre o estresse emocional pré-cirúrgico. Outro fator potencialmente importante na introdução de vícios diz respeito à necessidade de recordação de fatos ocorridos há décadas passadas, como a idade à menarca e à primeira gestação, sobretudo nas mulheres mais velhas.

Crê-se que a importância de se descrever o perfil de variáveis sócio-demográficas, reprodutivas, clínicas e nutricionais de mulheres com câncer de mama, sem tratamento prévio, pode vir a apontar algumas evidências de interesse para a compreensão dos mecanismos multicausais envolvidos na história natural dessa doença. Desta forma, os

padrões de distribuição das variáveis emergentes desta análise apontam para certas considerações importantes a serem destacadas.

Em relação às variáveis sócio-demográficas, apesar de alguns estudos terem mostrado que estes fatores podem estar associados a um maior risco de câncer de mama, a magnitude dessa associação ainda é fraca ou inexistente (28, 29). A idade, no entanto, constitui o fator de risco mais importante e mais conhecido para a gênese do câncer de mama (30). Semelhantemente aos resultados deste estudo, os dados de incidência dos Registros de Câncer de Base Populacional de diferentes cidades brasileiras indicam que a maioria dos casos novos ocorre acima dos 40 anos de idade (31).

Ao contrário dos fatores sócio-demográficos, variáveis reprodutivas e hormonais são reconhecidamente consideradas na etiologia do câncer de mama, pois proporcionam maior exposição do tecido mamário aos hormônios esteróides sexuais, aumentando a probabilidade de ocorrer a mutação genética que precede o câncer ao estimularem o processo de divisão (mitose) celular (3-5). As prevalências de menarca até os 12 anos (40%), de uso de contraceptivos hormonais orais (87,5%) e de terapia de reposição hormonal (27,5%), observadas, são maiores do que as encontradas no estudo caso-controle de Beji e Reis (6), onde se notou prevalências entre os casos (n = 405) de 38,3%, 77% e 11,9%, respectivamente. Estes autores demonstraram que estas variáveis estavam associadas ao risco de desenvolvimento do câncer de mama. A história de aborto teve alta prevalência (38%), comparada ao estudo caso-controle de Becher et al (3) (17,6%) que observou um risco aumentado para a doença em mulheres com história de aborto. A maioria das mulheres, em estado de menopausa, tiveram seu início após os 50 anos de idade (56%), resultado semelhante ao estudo caso-controle de Titus-Ernstoff et al (32) (55%), porém menor do que o estudo de Tessaro et al (33) (70%).

Em seu conjunto, os resultados do presente estudo indicam para um padrão elevado de exposição hormonal endógena e exógena nas mulheres entrevistadas ao longo de sua vida reprodutiva. Portanto, poder-se-ia supor que essas mulheres estiveram mais propensas à formação de células mamárias atípicas, decorrente de uma maior ocorrência de estímulos contínuos ao processo de divisão celular na mama, passíveis de interagirem com agentes cancerígenos do meio ambiente.

Outro aspecto de destaque a ser avaliado diz respeito à elevada prevalência (42,5%) de mulheres com casos de câncer de mama em familiares. A história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau foi relatada por 35% das entrevistadas, prevalência

superior à encontrada por Beji e Reis (6) (12,9%) que observaram um risco para o câncer de mama duas vezes maior entre as mulheres com história familiar da doença.

Em estudos epidemiológicos, a elevada prevalência de tabagismo tem sido associada a um aumentado risco de câncer de mama (9, 12). No estudo de Sagiv et al (12), a prevalência de tabagismo nas mulheres, com câncer de mama, foi semelhante (55%) à observada no presente estudo (50%).

O perfil alimentar das mulheres entrevistadas constitui outra consideração importante a ser avaliada. Ainda que a compreensão sobre o papel da dieta, no desenvolvimento do câncer de mama apresente controvérsias (10, 11, 14), há evidências de que o elevado consumo de carnes, principalmente carne vermelha ou rica em gordura, e gorduras em geral atuam como fatores de risco (13, 14), enquanto o consumo de frutas e verduras ricas em fibras e antioxidantes desempenha efeito protetor contra o desenvolvimento desta neoplasia (10, 14). O padrão alimentar observado na população estudada é o de uma dieta rica em carnes e óleos e gorduras de adição, pobre em verduras, cereais integrais, frutas e laticínios. Este perfil alimentar, associado ao sedentarismo, parece refletir-se na elevada prevalência de excesso de peso (70%) observada.

A elevada prevalência de sobrepeso e obesidade na população estudada (70%), especialmente em mulheres pós-menopausa (54% dos casos de sobrepeso e obesidade eram de mulheres na pós menopausa), merece destaque. No estudo caso-controle, realizado no Rio de Janeiro, por Vasconcelos et al (34), apesar de não ter sido observado associação entre IMC e câncer de mama em mulheres pós-menopausa, a prevalência de sobrepeso e obesidade dos casos foi de 64%, com 84,5% dessas mulheres na pós-menopausa. Já Iwasaki et al (8) verificaram uma associação positiva entre IMC e câncer de mama na pós-menopausa e, semelhantemente ao nosso estudo, a maioria (54%) dos casos da doença com excesso de peso eram pós-menopausa. O papel do IMC elevado sobre o risco de câncer de mama é, provavelmente, devido ao seu efeito sobre as concentrações do estrogênio endógeno, uma vez que mulheres com IMC alto e maior quantidade de tecido adiposo apresentam maiores concentrações de aromatase, enzima que catalisa a conversão de andrógenos em estrógenos (35).

Além de todos os fatores acima discutidos, a HAS também tem sido associada a um aumentado risco para o desenvolvimento do câncer de mama (6, 36). Neste estudo, no entanto, a prevalência de HAS (27,5%) foi menor do que a encontrada nas mulheres com câncer de mama dos estudos de Beji e Reis (6) (57%) e Largent et al (36) (32,9%).

Em resumo, o padrão de distribuição de variáveis reprodutivas, nutricionais e de estilo de vida dos casos novos de câncer de mama avaliados, poderia ser categorizado, em seu conjunto, como de elevado risco para o desenvolvimento da doença. Conhecer o perfil dessas variáveis, em pacientes com câncer de mama, pode ser de grande valia na adoção de estratégias que objetivem modificar o padrão de distribuição de fatores de risco, passíveis de intervenção associados a esta doença. A modificação de determinados fatores, tais como tabagismo, sobrepeso, obesidade, sedentarismo e dieta em mulheres com câncer de mama pode contribuir significativamente para melhorar a terapêutica clínica e reduzir o risco de recidiva da doença.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de mestrado a FGK Vieira e ao Laboratório A P Anatomia Patológica pelo auxílio no estadiamento da doença.

Referências

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2008: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007.
2. Nkondjock A, Ghadirian P. Risk factors and risk reduction of breast cancer. *Med Sci* 2005; 21: 175-80.
3. Becher H, Schmidt S, Chang-Claude J. Reproductive factors and familial predisposition for breast cancer by age 50 years. A case-control-family study for assessing main effects and possible gene-environment interaction. *Int J Epidemiol* 2003; 32: 38-48.
4. Yavari P, Mosavizadeh M, Sadrol-Hefazi B, Mehrabi Y. Reproductive characteristics and the risk of breast cancer--a case-control study in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005; 6: 370-5.
5. Shantakumar S, Terry MB, Teitelbaum SL, Britton JA, Millikan RC, Moorman PG, et al. Reproductive factors and breast cancer risk among older women. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 102: 365-74.
6. Beji NK, Reis N. Risk factors for breast cancer in Turkish women: a hospital-based case-control study. *Eur J Cancer Care* 2007; 16: 178-184.
7. Couto E, Hemminki K. Estimates of heritable and environmental components of familial breast cancer using family history information. *Br J Cancer* 2007; 96: 1740-2.

8. Iwasaki M, Otani T, Inoue M, Sasazuki S, Tsugane S. Body size and risk for breast cancer in relation to estrogen and progesterone receptor status in Japan. *Ann Epidemiol* 2007; 17: 304-12.
- 9 Manjer J, Johansson R, Lenner P. Smoking is associated with postmenopausal breast cancer in women with high levels of estrogens. *Int J Cancer* 2004; 112: 324-28.
10. Di Pietro PF, Medeiros NI, Vieira FGK, Fausto MA, Belló-Klein A. Breast cancer in southern Brazil: association with past dietary intake. *Nutr Hosp* 2007; 22: 565-72.
11. Lissowska J, Gaudet MM, Brinton LA, Peplonska B, Sherman M, Szeszenia-Dabrowska N, et al. Intake of fruits, and vegetables in relation to breast cancer risk by hormone receptor status. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107: 113-17.
12. Sagiv SK, Gaudet MM, Eng SM, Abrahamson PE, Shantakumar S, Teitelbaum SL, et al. Active and passive cigarette smoke and breast cancer survival. *Ann Epidemiol* 2007; 17: 385-93.
13. Steck SE, Gaudet MM, Eng SM, Britton JA, Teitelbaum SL, Neugut AI, et al. Cooked meat and risk of breast cancer lifetime versus recent dietary intake. *Epidemiology* 2007; 18: 373-82.
14. Kallianpur AR, Lee SA, Gao YT, Lu W, Zheng Y, Ruan ZX, et al. Dietary animal-derived iron and fat intake and breast cancer risk in the Shanghai Breast Cancer Study. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107: 123-32.
15. Thomson CA, Rock CL, Caan BJ, Flatt SW, Al-Delaimy WA, Newman VA, et al. Increase in cruciferous vegetable intake in women previously treated for breast cancer participating in a dietary intervention trial. *Nutr Cancer* 2007; 57: 11-9.
16. Demark-Wahnefried W, Clipp EC, Lipkus IM, Lobach D, Snyder DC, Sloane R et al. Main outcomes of the FRESH START trial: a sequentially tailored, diet and exercise mailed print intervention among breast and prostate cancer survivors. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2709-18.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos. 6 th ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004.
18. Jelliffe JD, Jelliffe EFP. Community nutritional assessment with especial reference to less technically developed countries. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1989.
19. World Health Organization (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on obesity. Geneva: WHO; 2000.
20. Sichieri R, Everhart MD. Validity of a Brazilian food frequency questionnaire against dietary recalls and estimated energy intake. *Nutr Res* 1998; 19: 1649-59.
21. Zabotto CB. Registro fotográfico para inquéritos dietéticos. Campinas: Unicamp; 1996.
22. Griswold RM. Estudo experimental dos alimentos. São Paulo: Edgard Blücher; 1972.

23. Ben ML. Quanto pesa?: tabela de pesos e medidas de alimentos. Porto Alegre: Ediplat; 2007.
24. Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecry EH, Gomes MCS Costa VM. Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras. 5th ed. São Paulo: Atheneu; 2005.
25. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia Alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
26. Secretaria de agricultura do Estado de São Paulo. Tabela de safra. Disponível em: <http://www.agroportal.sp.gov.br> Acesso em: setembro de 2007.
27. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients). Washington: National Academy Press, 2000. Disponível em: <http://www.nap.edu/> Acesso em: setembro de 2007.
28. Collar MCD, Molina PO, Orbaiz RV, Vicente RA, Arbiza PA, Purón MEC. Epidemiological characteristics of breast cancer development in pre and postmenopausal women. *Med Clin* 2000; 115: 281-86.
29. Dalton SO, Düring M, Ross L, Carlsen K, Mortensen PB, Lynch J, et al. The relation between socioeconomic and demographic factors and tumour stage in women diagnosed with breast cancer in Denmark, 1983-1999. *Br J Cancer* 2006; 95: 653-9.
30. Smigal C, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Howe HL, et al. Trends in Breast Cancer by Race and Ethnicity: Update 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 168-83.
31. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria nacional de assistência à saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional. 3th ed. Rio de Janeiro: INCA; 2003.
32. Titus-Ernstoff L, Longnecker MP, Newcomb PA, Dam B, Greenberg ER, Mittendorf R, et al. Menstrual Factors in Relation to Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 783-89.
33. Tessaro S, Béria JU, Tomasi E, Victora CG. Breastfeeding and breast cancer: a case control study in southern Brazil. *Cad Saude Publica* 2003; 6: 1593-1601.
34. Vasconcelos AB, Mendonça GAS, Sichieri R. Height, weight, weighty change and risk of breast cancer in Rio de Janeiro, Brazil. *Sao Paulo Med J* 2001; 2: 62-66.
35. Lukanova A, Lundin E, Zeleniuch-Jacquotte A, Muti P, Mure A, Rinaldi S, et al. Body mass index, circulating levels of sex-steroid hormones, IGF-I and IGF-binding protein-3: a cross-sectional study in healthy women. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 161-71.
36. Largent JA, McEligot AJ, Ziogas A, Reid C, Hess J, Leighton N, et al. Hypertension, diuretics and breast cancer risk. *J Hum Hypertens* 2006; 20: 727-32.

CAPÍTULO 5

FACTORS ASSOCIATED WITH OXIDATIVE STRESS IN BREAST CANCER WOMEN

Artigo formatado de acordo com as normas da Revista Nutrition (Qualis A Internacional)

(ANEXO E)

Factors associated with oxidative stress in breast cancer women

Factors associated with oxidative stress

Word Count: 6000 words

Tables: 6

Address for correspondence: Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Universitário. Trindade, Cep 880109970. Florianópolis/SC - Brasil. Fone: (048) 3721 8014. Fax: (048) 3721 9542. E-mail: fariadipietro@gmail.com Correspondence to: Patrícia Faria Di Pietro.

Acknowledgements

We acknowledge the Post-graduate Program in Nutrition of the Federal University of Santa Catarina, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial help.

Abstract

Objective: To investigate the association between oxidative stress blood levels and physiologic and behavioral factors in women with breast cancer.

Methods: Forty women newly diagnosed with breast cancer were chosen for the study. The extent of oxidative stress levels was evidenced by plasma thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), plasma lipid hydroperoxides (LOOH), plasma protein carbonyl, serum total antioxidant capacity (TAC) and erythrocyte reduced glutathione (GSH) was estimated. Diet data were obtained from food frequency questionnaire. Association between oxidative stress blood levels and physiologic and behavioral factors was analyzed using a logistic regression model.

Results: The logistic regression final model for plasma LOOH levels show that the positive axillary lymph node status (odds ratio [OR]=0.07; 95% confidence interval [CI_{95%}]=0.00-0.62), daily intake of low-fat dairy (OR=0.94; CI_{95%}=0.90-0.99) and high vitamin C fruits (OR=0.49; CI_{95%}=0.24-0.99) were negatively associated with increased plasma LOOH levels and oils intake (OR=2.98; CI_{95%}=1.12-7.93) was associated with a higher risk of increased plasma LOOH levels. Daily intake of processed meats (OR=2.20; CI_{95%}=1.03-4.68) and animal fat (OR=12.72; CI_{95%}=1.09-147.82) were factors positively associated with decreased serum TAC levels and daily intake of dairy products (OR=0.46; CI_{95%}=0.25-0.84) and cruciferous vegetables (OR=0.57; CI_{95%}=0.35-0.92) were the protective factor against decreased serum TAC levels. In multivariate analyses, family income above two minimum wage (OR=18.0, CI_{95%}=1.63-198.5) was positively associated with increased erythrocyte GSH levels. Plasma TBARS and protein carbonyl levels were not associated with variables examined in univariate logistic regression.

Conclusion: These data would permit a better understanding of the role that the factors investigated play in the oxidative stress.

Key words: breast cancer, oxidative stress, dietary intake, risk factors

Introduction

Oxidative stress is caused by an unfavorable balance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses [1]. Oxidative stress, mediated by ROS, is responsible for DNA, lipid and protein damage and play an important role in the

development and progression of many human diseases, including cancer [2]. Several markers of lipid peroxidation are currently available. Among them, lipid hydroperoxides (LOOH) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) have been used extensively as markers of oxidative stress in epidemiologic and clinical studies [3, 4]. Protein carbonyl levels is the most frequently used biomarker of protein oxidation and several methods of detection are available [5], including a colorimetric assay based on derivatization of the carbonyl group with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) [6].

To control the overproduction of ROS, the cells protect themselves against oxidative stress by antioxidant detoxifying mechanisms, which include nonenzymatic antioxidants such as reduced glutathione (GSH), vitamins A, C and E and various antioxidant enzymes [7]. Erythrocyte glutathione levels have been commonly employed as markers of oxidative stress because GSH is a widely distributed cellular reductant. In addition, the levels of erythrocyte glutathione may reflect the glutathione activity in other tissues [8].

Because of the difficulty in measuring all known antioxidants separately and the interactions among different antioxidant species, several methods have been developed to assess the total antioxidant capacity (TAC) of serum or plasma [9, 10, 11]. These methods provide an overview of the biological interactions between individual antioxidant species and how efficiently these translate into host cell protection during periods of oxidative stress [12].

Identification of potentially modifiable factors for oxidative stress is an increasingly important task. Dietary intake represents one such set of factors that have recently received a great attention because of its ability to either reduce or promote oxidative stress [13, 14, 15, 16].

In the present study, we analyzed the association between oxidative stress blood levels (measured by TBARS, LOOH, protein carbonyl, GSH and TAC) and physiologic and behavioral factors in a group of women newly diagnosed with breast cancer

Materials and Methods

Subjects and blood samples

The present study was based on 40 women newly diagnosed with breast cancer, attending the surgical unit of Carmela Dutra Maternity, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, who had not undergone any previous treatment for their tumors. They were classified anatomopathologically according to the Tumor-Node-Metastasis system [17]. All women over 60 years old with breast cancer were excluded during data collection, due to potential recall bias. None of the patients were pregnant or lactating. The study was approved by the ethical committee of Federal University of Santa Catarina and informed consents were obtained from all the participants.

Blood samples were obtained by venous arm puncture into EDTA or serum-separation gel tubes after overnight fasting between 7 and 8 AM. Plasma and serum were isolated by blood centrifugation at 1000 x g, for 10 min. An aliquot of EDTA-blood was immediately acidified with TCA 30 % for GSH measurement. Plasma samples were used for TBARS, LOOH and carbonyls measurements and the serum was used to measure the total antioxidant capacity. TBARS and LOOH levels were analyzed immediately after sample collection. Remaining plasma, serum and acid extract were stored at - 70° C for no longer than 1 month for other biochemical determinations, according to Firuzi et al. [18]. All measurements were performed in duplicate.

Reagents

Thiobarbituric acid (TBA), butylated hydroxytoluene (BHT), 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), trichloroacetic acid (TCA), 1,1,3,3-tetramethoxypropan (TMP), triphenylphosphine (TPP), glutathione reduced (GSH), 2,4,6-tris(2-pyridil)-s-triazina (TPTZ), 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), guanidine hydrochloride, 2,4-Dinitrophenylhydrozine (DNPH), bovine serum Albumin (BSA) were obtained from Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA). Methanol (HPLC-grade) was from Tedia Company Inc. (Fairfield, OH, USA). Xylenol orange, ammonium ferrous sulfate hexahydrate and potassium phosphate monobasic were purchased from Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, RJ-Brasil). Sulfuric acid 96% and ethyl acetate were

obtained from Carlo Erba (Rodano Milano, Italy). Hydrogen peroxide was from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals and reagents used in the study were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

Lipid hydroperoxides

Plasma levels of lipid hydroperoxide (LOOH) were determined by the ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange (FOX), as described by Jiang et al. [19]. FOX solution was made mixing two solutions I and II. Solution I was prepared dissolving 4.4 mM butylated hydroxytoluene in pure methanol. Solution II consisted of 1 mM xylenol orange and 2.5 mM ammonium ferrous sulfate dissolved in 250 mM sulfuric acid. Working solution was prepared by mixing solutions I and II at a proportion of 9:1 (v/v), respectively. Solution II was kept at 4° C for a maximum of 2 weeks. For measuring LOOH in plasma, 130 μ L of plasma was mixed with 20 μ L 20 mM triphenylphosphine (TPP) in methanol or with 20 μ L of methanol in 2.0-mL microcentrifuge vials. The vials were incubated at room temperature in the dark for 30 min and vortex-mixed every 10 min before adding 1.4 mL of FOX solution. The samples were then incubated again for 1 hr at room temperature in the dark, being vortex-mixed every 10 min, and centrifuged at 16,000 x g for 10 minutes. Absorbance of supernatants was read at 560 nm and the absorbance of the samples treated with TPP was subtracted from non-treated samples. To calculate the concentration of LOOH (μ mol/L) a standard hydrogen peroxide curve was used and the results were expressed as μ mol/L.

Thiobarbituric reactive substances (TBARS)

Lipid peroxidation of plasma was estimated by the measurement of TBARS according to the method of Esterbauer and Cheeseman [20] based on development of a pink color by the reaction of thiobarbituric acid (TBA) with malondialdehyde, a secondary product of lipid peroxidation. For measuring TBARS in plasma, 250 μ L of plasma or deionized water (blank) was mixed with 50 μ L 10 mM butylated hydroxytoluene (BHT) in pure methanol and 20% trichloroacetic acid (TCA) in 0.5 N hydrochloric acid (HCl) in test-tubes. Subsequently, 500 μ L 1% TBA were added to all tubes, vortex-mixed and placed in a water bath at 100° C for 1 hr. After this period, the samples were cold in ice-bath, added 2.5 mL of butyl alcohol, vortex-mixed and centrifuged at 1000 x g for 5 min.

The absorbance of the supernatant was subsequently measured at 532 nm against the blank. 1,1,3,3-tetramethoxypropan (TMP) at five different concentrations were used to obtain a calibration curve on each day of experiment and the TBARS concentration was expressed as $\mu\text{mol/L}$.

Carbonylated protein

Carbonyl groups in plasma protein were determined using the reagent 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) as described by Levine et al (1990). One hundred microliters of plasma were mixed with 600 μL of 10 mM DNPH in 2 N HCl in 1.5-mL microcentrifuge tubes in duplicate. Six hundred microliters of 2 N HCl were added to 100 μL of plasma as blank. The tubes were vortex-mixed every 10 min and after 1 h of incubation at room temperature in the dark, 600 μL of 20 % trichloroacetic acid (TCA) was added. After another 10 min of incubation all the samples were centrifuged at 11,000 $\times g$ for 5 min. Then the supernatant was discarded and the precipitates were washed 3 times with 800 μL of a mixture of ethanol:ethyl acetate, 1:1 (v/v) and centrifuged after 10 min. Finally, the protein precipitates were dissolved in 900 μL of 6 M guanidine hydrochloride in 20 mM KH_2PO_4 adjusted to pH 2.3 with diluted trifluoroacetic acid. The samples were then incubated again for 1 h at 37° C. The absorbance test sample was measured at 360 nm with a spectrophotometer against guanidine solution as blank. Total protein concentration in samples was determined by the measurement of the absorbance of blank at 280 nm, using bovine serum albumin as standard. The concentration of carbonyls (nmol/mg protein) was calculated using a molar extinction coefficient (ϵ) of 22.000 (Levine et al 1990).

Reduced glutathione

Virtually, most of nonprotein sulfhydryl compounds in red cells are in the form of reduced glutathione (GSH). Erythrocyte GSH levels was determined by method of Beutler et al. [8] based on the development of a yellow color when 5,5' Dithiobis (2-nitro benzoic acid) (DTND) is added to compounds containing sulfhydryl groups. Firstly, an aliquot of the total blood was hemolyzed with cold water and the proteins were precipitated by the addition of 30% TCA. Fifty microliters of the hemolysed sample or deionized water (blank) were mixed with 800 μL of 200 mM phosphate buffer pH 8. Subsequently, 50 μL

of 10 mM DTNB in 200 mM phosphate buffer were added to all tubes and after 3 min the absorbance was measured at 412 nm against the blank. Reduced glutathione at four different concentrations was used to obtain a calibration curve on each day of experiment and the GSH concentration was expressed as $\mu\text{mol/L}$.

Total antioxidant capacity of serum

The total antioxidant capacity (TAC) of serum was determined by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay as described by Benzie and Strain [9]. To prepare the FRAP solution, 10 mL of 300 mM acetate buffer, adjusted to pH 3.6 by addition of acetic acid, were mixed with 1 mL of 20 mM ferric chloride hexahydrate dissolved in distilled water and 1 mL of 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) dissolved in HCl 40 mM. Ten microliters of serum were added to 1 mL of a freshly prepared FRAP solution in test-tubes in duplicate and the absorbance was measured at 593 nm after 15 min of incubation at 37° C against a blank of FRAP solution. Trolox, a vitamin E water-soluble analogue, at five different concentrations was used to obtain a calibration curve on each day of experiment and the TAC concentration was expressed as $\mu\text{mol/L}$ Trolox equivalents.

Dietary Data collection and Analysis

Usual dietary intake was obtained using the food frequency questionnaire, previously validated in Brazil [21], containing 94 foods items classified into ten groups: cereals, fruits, vegetables, beans, meat and eggs, dairy products, oils and fat, sweets, alcoholic beverages and non-alcoholic beverages. For each food item the participants determined the size of the consumed portion with help of an album containing colour photographs of products [22] or household measures of different sizes commonly utilized, and the subjects were asked how often they had consumed that food throughout the previous year. The conversion of portions related for grams and milliliters of fruits, doughnut, pig lard, cream and mate were obtained according with the assay described by Griswold [23] in Technical Dietetic Laboratory of Federal University of Santa Catarina. The grams of portions for polenta were obtained from Ben [24] and for others foods from Pinheiro et al. [25].

Dietary intake was analyzed by grams and milliliters of specific food groups determined by traditional food groups [26] and the *a-priori* hypotheses. For each subject, individual dietary intake was converted to a monthly frequency variable weighted (in grams or milliliters) by reported portion size. These individual values were summed to create the specific food groups and divided by 30 to determine an average daily level of intake (grams or milliliters per day).

Anthropometric measurements were performed in a nutritional environment by trained researchers using standard procedures [27]. Height was measured to the nearest centimeter and weight to the nearest 100 g with a anthropometric balance (FILIZOLA®). Body mass index (BMI) was calculated as weight (in Kilograms) divided by height (in meters) squared and was categorized according World Health Organization [28].

Statistical analysis

All statistical analysis was performed using Stata 9.0 software [29]. Descriptive values are reported as mean \pm standard deviations, or mean \pm standard error of mean, and median values. Shapiro-Wilk test was used to evaluate the normal distribution of continuous variables. The continuous variables with normal distributions were compared by *t* test and when data distribution was non-parametric, Mann-Whitney U test was used for independent samples. Chi-square and Fisher's exact tests were used for categorical variables [30].

Biochemical measurements and dietary intake were categorized as percentiles ($\leq 50^{\text{th}}$, $>50^{\text{th}}$). Factors associated with levels higher than $>50^{\text{th}}$ values of plasma TBARS, plasma LOOH, plasma protein carbonyl and erythrocyte GSH, and $\leq 50^{\text{th}}$ values of serum TAC were analyzed using a logistic regression model [31]. Univariate analysis was performed, and Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals ($CI_{95\%}$) were used to quantify the association between risk factors and biochemical percentiles. In logistic regression model, the consumption of food groups was analyzed for each additional 10 or 100 grams or milliliters per day intake $>50^{\text{th}}$. These units were chosen to detect small changes in OR.

Those variables that presented $p < 0.25$ in univariate analysis were employed in the multivariate regression model. Variables that presented collinearity or low frequency were excluded from the multivariate model, whilst variables with more than two categories were

transformed into indicator (dummy) variables. The models were constructed using the backward selection of the variables. The likelihood-ratio test was used to define the multivariate final model [31]. Variables evaluated including age, anatomopathological stage, axillary lymph node status, education, family income, nutritional status (BMI), menopausal status and intake daily of food groups. Differences were considered significant at the 5% level.

Results

At admission, 37.5% of the women had been diagnosed with anatomopathological stage I breast cancer, 32.5% in stage II and 22.5% in stage III. Premenopausal status were observed in 55% of the women. The average age was 48 ± 7.4 years (median: 49, range 33-60 years). The average BMI of the women was 27.5 ± 4.7 kg/m² (range 17.7-38.8 kg/m²)

The average plasma LOOH level was 0.94 ± 0.37 $\mu\text{mol/L}$ (median: 0.88, range 0.28-1.85 $\mu\text{mol/L}$). The average plasma TBARS level was 4.96 ± 0.90 $\mu\text{mol/L}$ (median: 4.77, range 3.42-6.85 $\mu\text{mol/L}$). The average plasma protein carbonyl level was 0.66 ± 0.24 nmol/mg protein (median: 0.61, range 0.36-1.48 nmol/mg protein). The average serum TAC level was 635.7 ± 131.1 $\mu\text{mol/L}$ (median: 676.3, range 409.7-896.6.36-1.48 $\mu\text{mol/L}$). The average erythrocyte GSH level was 81.3 ± 16.1 $\mu\text{mol/L}$ (median: 79.6, range 52.0-116.3 $\mu\text{mol/L}$).

When the oxidative stress blood levels were analyzed according to nutritional status, anatomopathological stage, age groups and menopausal status no significant differences were detected (data not shown).

When the oxidative stress levels were analyzed according to food groups intake for grams or milliliters per day, plasma LOOH levels was significantly higher in women with intake of high carotenoids vegetables lower or equal 14.5 g/d and the serum TAC levels was significantly lower in women with intake of meat and eggs higher 139 g/d, red meat higher 67.5 g/d and non-alcoholic beverages higher 652mL/d. Plasma TBARS levels was significantly higher in women with intake of fish higher 6.1g/d. No significant associations were found between erythrocyte GSH and plasma protein carbonyls levels and food groups intake for grams or milliliters per day (Table 1).

Table 1 Relations of dietary intake associated with oxidative stress levels in breast cancer newly diagnosed women (n=40), Florianópolis, SC – Brazil.

Percentile of daily dietary intake	N	LOOH ¹	TBARS ¹	Protein carbonyl ²	GSH ¹	TAC ¹
		Median	Mean±SD	Median	Mean±SD	Mean±SD
Cereals						
≤50 th (294.7g/d)	20	0.85	4.76±0.73	0.59	84.6±14.9	628.2±127.5
>50 th	20	0.89	5.16±1.01	0.68	78.0±16.9	642.6±137.5
Fruits						
≤50 th (282.4g/d)	20	0.85	4.97±0.81	0.66	84.0±15.6	622.6±135.4
>50 th	20	0.89	4.95±1.00	0.61	78.5±16.5	648.8±128.7
High vitamin C fruits						
≤50 th (174.8g/d)	20	0.87	5.00±0.82	0.62	82.4±16.3	631.7±135.4
>50 th	20	0.89	4.92±0.98	0.66	80.2±16.2	639.7±130.0
High carotenoids fruits						
≤50 th (8.6g/d)	20	0.82	4.98±0.93	0.61	83.6±13.8	654.0±147.0
>50 th	20	0.94	4.94±0.89	0.65	79.0±18.2	617.4±113.7
Vegetables						
≤50 th (95.6g/d)	20	0.83	4.77±0.78	0.59	84.7±15.6	648.7±128.4
>50 th	20	0.90	5.15±0.98	0.72	77.8±16.2	622.6±135.7
High carotenoids vegetables						
≤50 th (14.5g/d)	20	0.94*	4.89±0.76	0.64	82.3±16.8	630.2±138.3
>50 th	20	0.72	5.04±1.03	0.66	80.2±15.7	641.2±126.7
Cruciferous vegetables						
≤50 th (19.6g/d)	20	0.82	4.84±0.87	0.61	84.5±15.8	620.2±147.5
>50 th	20	0.90	5.08±0.93	0.72	78.0±16.1	651.1±114.0
Beans						
≤50 th (65.0g/d)	24	0.95	4.93±0.94	0.61	82.0±17.3	639.4±126.7
>50 th	16	0.82	5.00±0.85	0.72	80.2±14.5	630.1±141.3
Meat and eggs						
≤50 th (139.0g/d)	20	0.84	5.03±0.83	0.59	81.9±15.7	694.2±125.3*
>50 th	20	0.94	4.89±0.97	0.69	80.6±16.8	577.2±111.1
Red meat						
≤50 th (67.5g/d)	20	0.85	5.00±0.73	0.61	79.0±13.8	686.7±113.6**
>50 th	20	0.89	4.92±1.05	0.69	85.5±18.2	584.7±129.9
Fish						
≤50 th (6.1g/d)	20	0.86	4.77±0.74**	0.61	80.2±16.8	669.3±132.3
>50 th	20	0.89	5.43±0.87	0.61	80.9±18.1	681.8±117.3
Chicken						
≤50 th (28.9g/d)	20	0.82	5.19±0.84	0.63	80.0±15.9	700.8±116.9
>50 th	20	0.99	5.01±0.90	0.64	81.0±18.8	650.2±127.7
Processed meat						
≤50 th (3.7g/d)	20	0.85	4.79±0.75	0.59	85.2±16.6	656.3±129.1
>50 th	20	0.89	5.13±1.01	0.66	77.4±15.0	615.1±133.0

Table continues

Table 1 Continued

Percentile of daily dietary intake	N	LOOH ¹	TBARS ¹	Protein carbonyl ²	GSH ¹	TAC ¹
		Median	Mean±SD	Median	Mean±SD	Mean±SD
High-fat meat						
≤50 th (66.5g/d)	20	0.82	5.05±0.80	0.66	82.5±15.8	659.1±134.6
>50 th	20	0.99	4.87±0.99	0.62	80.0±16.6	612.3±126.4
Low-fat meat						
≤50 th (52.9g/d)	20	0.95	4.84±0.96	0.66	80.0±17.2	624.9±118.2
>50 th	20	0.75	5.08±0.84	0.62	82.5±15.2	646.5±145.0
Dairy products						
≤50 th (306.7g/d)	20	0.87	4.87±0.82	0.64	83.7±16.4	605.6±103.6
>50 th	20	0.88	5.05±0.98	0.64	78.9±16.1	665.8±150.4
Low-fat dairy						
≤50 th (3.5g/d)	20	1.03	5.10±0.78	0.59	82.6±18.1	601.0±111.3
>50 th	20	0.84	4.82±1.00	0.69	79.9±14.1	670.4±142.6
High-fat dairy						
≤50 th (131.0g/d)	20	0.81	4.75±0.77	0.57	85.0±17.1	641.4±115.9
>50 th	20	0.90	5.17±0.98	0.69	77.5±14.5	630.0±147.5
Oils and fat						
≤50 th (23.9g/d)	20	0.89	4.88±0.81	0.59	80.4±16.4	658.3±129.7
>50 th	20	0.87	5.04±0.99	0.72	82.1±16.1	613.0±131.7
Oils						
≤50 th (20.0g/d)	20	0.89	4.72±0.81	0.59	80.9±16.8	640.6±145.2
>50 th	20	0.87	5.20±0.94	0.72	81.6±15.7	630.8±118.8
Fat animal						
≤50 th (1.7g/d)	22	0.78	5.18±0.94	0.64	77.4±14.1	663.9±119.5
>50 th	18	0.94	4.69±0.78	0.63	86.0±17.4	601.2±139.5
Sweets						
≤50 th (37.1g/d)	20	0.87	4.78±0.87	0.59	85.3±19.5	629.5±130.9
>50 th	20	0.88	5.14±0.91	0.66	77.3±10.7	641.9±134.3
Alcoholic beverages						
≤50 th (0mL/d)	29	0.90	4.98±0.94	0.64	81.6±17.3	649.1±134.6
>50 th	11	0.88	4.90±0.82	0.71	80.3±13.1	600.3±119.8
Non-alcoholic beverages						
≤50 th (652.0mL/d)	20	0.89	4.96±0.78	0.57	81.6±17.2	678.5±128.4**
>50 th	20	0.86	4.96±1.02	0.72	81.0±15.4	592.8±122.0

¹μmol/L²nmol/mg protein**p* < 0.005; ***p* < 0.05; as compared with daily dietary intake Percentile >50th.

Plasma TBARS and protein carbonyl levels were not associated with variables examined in univariate logistic regression (data not shown).

Table 2 shows the crude odds ratio of the variables selected for the construction the final model for increased plasma levels of LOOH. In the univariate logistic regression analysis no factors were associated with LOOH increased.

Table 2 Crude Odds ratio for increased plasma lipid hydroperoxide levels (LOOH) obtained by logistic regression in breast cancer newly diagnosed women (n = 40), Florianópolis, SC – Brazil.

	LOOH ($\mu\text{mol/L}$)		OR	95% CI	<i>p</i>
	P \leq 50 th	P $>$ 50 th			
Axillary lymph node status					
Negative	10	15	1.00		
Positive	10	5	0.33	0.08-1.27	0.11
Family income monthly (minimum wage)					
< 1	10	6	1.00		
1 – 1.99	8	8	1.66	0.40-6.81	0.48
2 – 3.6	2	5	4.16	0.60-28.62	0.15
High vitamin C fruits (100g/d)			0.72	0.46-1.15	0.18
Fruits (100g/d)			0.77	0.52-1.13	0.19
Low-fat dairy (10mL/d)			0.97	0.94-1.01	0.21
Oils (10g/d)			1.61	0.84-3.11	0.15

The table 3 shows the logistic regression final model for plasma levels of LOOH. Positive axillary lymph node status, daily intake of low-fat dairy and high vitamin C fruits were associated with low plasma levels of LOOH. Oils intake was associated with a higher risk for increased plasma levels of LOOH (Table 3).

Table 3 Risk factors for increased lipid hydroperoxide levels (LOOH) in breast cancer newly diagnosed women obtained in the logistic regression final model (n = 40), Florianópolis, SC – Brazil.

	OR	SE ¹	95% CI	<i>p</i>
Axillary lymph node status positive	0.07	0.8	0.00-0.62	0.02
Low-fat dairy (10mL/d)	0.94	0.024	0.90-0.99	0.04
Oils (10g/d)	2.98	1.48	1.12-7.93	0.03

¹SE = standard error

Table 4 shows the crude odds ratio of the variables selected for the construction the final model for decreased serum levels of total antioxidant capacity (TAC). Univariate logistic regression analysis suggested that the factors associated with low serum levels of TAC were: age \geq 50 years, non-alcoholic beverages daily intake and red meat daily intake.

The protective factors against decreased serum TAC levels were daily intake of dairy products and low-fat dairy.

Table 4 Crude Odds ratio for decreased serum total antioxidant capacity (TAC) levels in univariate logistic regression model in breast cancer newly diagnosed women (n = 40), Florianópolis, SC – Brazil.

	TAC ($\mu\text{mol/L}$)		OR	95% CI	<i>p</i>
	$P \leq 50^{\text{th}}$	$P > 50^{\text{th}}$			
Education (years)					
≤ 4	10	9	1.00		
5 – 8	4	4	0.58	0.10-3.09	0.53
9 – 16	6	7	0.25	0.05-1.16	0.08
Family income monthly (minimum wage)					
< 1	10	12	1.00		
1 - 1,99	6	4	0.25	0.05-1.16	0.08
Age	14	6			
33 - 49 years	6	14	1.00		
50 - 60 years			5.44	1.41-21.05	0.01
Menopausal status					
Premenopausal	13	9	1.00		
Postmenopausal	7	11	0.28	0.07-1.05	0.06
Non-alcoholic beverages (100mL/d)			1.18	1.01-1.38	0.03
Alcoholic beverages (10mL/d)			1.07	0.96-1.18	0.20
Processed meats (10g/d)			1.38	0.84-2.27	0.20
Red meat (10g/d)			1.20	1.02-1.42	0.03
Low-fat meat (10g/d)			1.08	0.95-1.24	0.21
Meat and eggs (100g/d)			2.16	0.85-5.48	0.10
Low-fat dairy (10mL/d)			0.94	0.90-0.99	0.03
Dairy products (100mL/d)			0.62	0.42-0.91	0.02
Cruciferous vegetables (10g/d)			0.75	0.55-1.02	0.07
Animal fat (10g/d)			2.76	0.64-11.81	0.17

The final statistical model (Table 5) indicated that the factors associated with low serum levels of TAC were daily intake of processed meats and animal fat. Daily intake of dairy products and cruciferous vegetables were the protective factor against high serum levels of TAC (Table 5).

Table 5 Risk factors for decreased serum total antioxidant capacity (TAC) levels in breast cancer newly diagnosed women obtained in the logistic regression final model (n = 40), Florianópolis, SC – Brazil.

	OR	SE ¹	95% CI	<i>p</i>
Cruciferous vegetables (10g/d)	0.57	0.13	0.35-0.92	0.02
Dairy products (100mL/d)	0.46	0.14	0.25-0.84	0.01
Processed meats (10g/d)	2.20	0.84	1.03-4.68	0.04
Animal fat (10g/d)	12.72	15.92	1.09-147.82	0.04

¹SE = standard error

Univariate logistic regression analysis suggested that the positive axillary lymph node status (OR=0.20; CI_{95%}=0.50-0.83, $p=0.027$) was associated with decreased levels of GSH and family income above two minimum wage (OR=18.0; CI_{95%}=1.63-198.5, $p=0.018$) was associated with high levels of GSH. In multivariate analyses, only the family income remained associated at GSH levels (data not show).

Discussion

One mechanism by which diet may help to prevent cancer is through modulation of oxidative stress status. The most common approach for the measurement of free radical and oxidative stress has been to measure products of free radical reactions with biologic macromolecules [4]. The literature has demonstrated that in experimental systems the oxidative stress can contribute to cancer development [32, 33]. The blood concentrations of lipid peroxidation and protein carbonyls has been shown to be elevated among breast cancer patients as has the tissue concentration in malignant breast biopsies [3, 7, 15, 16]. In this study, we examined physiologic and behavioral factors for their contribution to oxidative stress, as measured by the biomarkers of lipid peroxidation, as plasma levels of LOOH and TBARS, protein oxidation, as plasma levels of protein carbonyl and by the measurement of antioxidants, such as levels of erythrocyte GSH and serum TAC, among 40 women newly diagnosed with breast cancer.

Measurement of lipid peroxidation and polyunsaturated fatty acid oxidation has been most commonly employed. The resulting lipid-centered free radicals rearrange and react with molecular oxygen to form lipid hydroperoxides and, following reductive reactions, hydroxy derivatives. Hydrolysis of lipid hydroperoxides leads to a complex mixture of small acyl compounds, aldehydes, alcohols, and hydrocarbons.

One of these compounds, malondialdehyde, reacts with 2-thiobarbituric acid to form a fluorescent adduct; this is the most commonly employed method for assessing lipid peroxidation. However, the 2-thiobarbituric acid reaction is not exclusively specific for malondialdehyde (MDA), as other related compounds have been shown to react – hence the name thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) [20]. In this study, lipid peroxidation measured by TBARS only was associated with daily intake of fish. However, daily intake of low-fat dairy and high vitamin C fruits were associated with decreased plasma levels of LOOH levels, whereas that daily intake of oils was associated

with a higher risk for increased plasma levels of LOOH. The literature relating food intake to markers of lipid peroxidation has provided conflicting results [14, 34, 35]. The lack of association may be due to the lack of specificity of TBARS as a marker of lipid peroxidation [36]. However, even studies that have used more specific markers of lipid peroxidation or isoprostanes also have found inconsistent results [15, 37]. Among healthy individuals, significantly decreased plasma levels of MDA and isoprostanes were associated with higher fruit intake but neither total fat intake nor fat subtype [14]. Diets high in vegetables and fruit significantly decreased levels of isoprostanes excreted in urine but not decreased levels urinary of MDA in an intervention study with women participating in a program clinical for individuals at risk of breast cancer on family history [37]. The results this study may indicate that plasma levels of LOOH is a relatively more sensitive marker for detecting differences in peroxidation lipid than plasma levels of TBARS.

Positive axillary lymph node status was associated with decreased plasma levels of LOOH. In agreement with decreased levels of LOOH found in plasma of patients with breast cancer with presence of node invasion, Gerber et al. [38] and Saintot et al. [39] also reported decreased lipid peroxidation measured by plasma MDA in patients with presence of node invasion on cancers of various sites. There are several lines of evidence showing that the alteration of the oxidative stress status is associated with tumor progression, either when comparing various cancer sites at different invasion stages or when comparing various prognosis factors within the same cancer site. This alteration appears to be characterized by fast dividing cells and may be viewed as an adaptative response of cancer cells toward a selective growth advantage. It has been shown, indeed, that cancer cells that become resistant to drugs develop resistance to drugs by increasing the level of antioxidants enzymes. There is no argument to support a causal relationship between the alteration of the oxidative stress status and tumor progression. This change might only be an effect of tumor development, possibly reflecting tumor cell proliferation and invasion [38].

One assay that might have particular significance in assessing the extent of oxidative stress is the measure of protein oxidation. Damage to proteins may affect the function of such important molecules as receptors and enzymes, as well as contribute to the damage of other biomolecules, so the functional consequences of protein damage are significant. A particularly useful test of oxidative protein damage is the protein carbonyl

assay because it evaluates “general” protein damage as opposed to looking at the damage of specific amino acids [6]. In this study we did not see any association between the plasma levels of protein carbonyl and variables examined. Results of epidemiologic studies of association between levels of protein carbonyl and variables as age of subject, dietary intake, alcohol consumption, body mass index and menopausal status have been inconsistent [16, 40].

Concerning the association between the serum levels of TAC and variables examined, the final statistical model indicated that the factors associated with decreased serum levels of TAC were daily intake of processed meats and animal fat, whereas that the daily intake of dairy products and cruciferous vegetables were the protective factor against decreased serum levels of TAC. The results of other studies are conflicting. Whereas low levels of TAC was associated with the intake of red meat in study of Pitsavos et al. [41], association inverse was observed in study of Haldar et al. [42] and no association in study of Lesgards et al. [43]. Epidemiologic studies have demonstrated a positive association between fruits and vegetables intake and levels of TAC [41, 43, 44] despite some studies finding no association [42, 45]. Miller et al. [44] in the setting of a randomized, controlled feeding trial, observed increased levels of TAC with intake of a diet rich in fruits, vegetables and low-fat dairy products and reduced in red meat, sweets, sugar-sweetened beverages, saturated fat, total fat and cholesterol compared with control diets which is typical of what many Americans eat.

Glutathione, as a reductant, is very important in maintaining the stability of erythrocyte membranes. It is implicated in the cellular defense against xenobiotics and deleterious compounds, such as free radicals and hydroperoxides [46]. A decreased level of erythrocyte GSH has been reported in several diseases including malignancies [7, 47, 48]. Buser et al. [49] not observed association between positive axillary lymph node status and levels of erythrocyte GSH in patients with early and locally advanced breast cancer. The lower levels of erythrocyte GSH seen in breast cancer patients with positive axillary lymph node status support the hypothesis that the glutathione status is inversely related to malignant transformation [7, 47].

In multivariate analyses, family income higher than two minimum wage was associated with increased levels of erythrocyte GSH. Very few data exist on the relationship between levels of GSH and income. Similar results were observed by Zalani et

al. [50] in a study with pregnancy, which level of erythrocyte GSH was significantly higher in the high income group than the low income group.

The major weakness of the present study is its small sample size and our subsequent inability to make conclusive statements about a cause-effect relation between markers of oxidative stress status and variables examined in women newly diagnosed breast cancer. However, our study has the important advantage that all samples were collected before of surgery and of the onset of chemotherapy or radiation. It has been shown that recent treatment results in significant alteration of levels of oxidative stress markers in cancer patients [51, 52]. Other advantage of our study is the blood collection performed according to standardized procedures. In addition, we used multiple markers of oxidative stress status.

Conclusion

These data would permit a better understanding of the role that physiologic and behavioral factors investigated play in the oxidative stress.

References

- [1] Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl* 1986;25:1058-1071.
- [2] Galli F, Piroddi M, Annetti C, Aisa C, Floridi E, Floridi A. Oxidative stress and reactive oxygen species. *Contrib Nephrol* 2005;149:240-60.
- [3] Kumaraguruparan R, Kabalimoorthy, Nagini S. Correlation of tissue lipid peroxidation and antioxidants with clinical stage and menopausal status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Clin Biochem* 2005;38:154-58.
- [4] Trevisan M, Browne R, Ram M, Muti P, Freudenheim J, Carosella AM, et al. Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am J Epidemiol* 2001;154:348-56.
- [5] Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 2000;32:307-6.
- [6] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-478.

- [7] Yeh CC, Hou MF, Tsai SM, Lin SK, Hsiao JK, Huang JC, et al. Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clin Chim Acta* 2005;361:104-11.
- [8] Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963;61:882-90.
- [9] Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (frap) as a measure of antioxidant power: the frap assay. *Anal Biochem* 1996;239:70-76.
- [10] Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* 1998;44:1309-15.
- [11] Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000;29:1106-14.
- [12] Maxwell SR, Dietrich T, Chapple ILC. Prediction of serum total antioxidant activity from the concentration of individual serum antioxidants. *Clin Chim Acta* 2006;372:188-194.
- [13] Lasheras C, Gonzalez S, Huerta JM, Lombardia C, Ibanez R, Patterson AM, et al. Food habits are associated with lipid peroxidation in an elderly population. *J Am Diet Assoc* 2003;103:1480-87.
- [14] Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, et al. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol* 2002;156:274-85.
- [15] Rossner PJr, Gammon MD, Terry MB, Agrawal M, Zhang FF, Teitelbaum SL, et al. Relationship between urinary 15-F2t-isoprostane and 8-oxodeoxyguanosine levels and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:639-44.
- [16] Rossner PJr, Terry MB, Gammon MD, Agrawal M, Zhang FF, Ferris JS, et al. Plasma protein carbonyl levels and breast cancer risk. *J Cell Mol Med* 2007;11:1138-48.
- [17] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos. 6. ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004.
- [18] Firuzi O, Mladenka P, Riccieri V, Spadaro A, Petrucci R, Marrosu G, et al. Parameters of oxidative stress status in healthy subjects: their correlations and stability after sample collection. *J Clin Lab Anal* 2006;20:139-48.
- [19] Jiang ZY, Hunt JJ, Wolff SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem* 1992;202:384-89.
- [20] Esterbauer H, Cheeseman K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186: 407-21.
- [21] Sichieri R, Everhart MD. Validity of a brazilian frequency questionnaire against dietary recalls and estimated energy intake. *Nutr Res* 1998;19:1649-59.

- [22] Zabotto CB. Registro fotográfico para inquéritos dietéticos. Campinas: Unicamp; 1996.
- [23] Griswold RM. Estudo Experimental dos Alimentos. São Paulo: Edgard Blücher; 1972.
- [24] Ben ML. Quanto pesa?: tabela de pesos e medidas de alimentos. Porto Alegre: Ediplat; 2007.
- [25] Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecry EH, Gomes MCS, Costa VM. Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras. 2th ed. São Paulo: Atheneu; 2004.
- [26] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia Alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
- [27] Jelliffe JD, Jelliffe EFP. Community nutritional assessment with especial reference to less technically developed countries. 2th ed. London: Oxford University press; 1989.
- [28] World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on obesity. Geneva: WHO; 2000.
- [29] Stata Statistics Software: Release 9.0. College Station: Stata Corporation; 2005.
- [30] Armitage P, Berry G, Matthews, JNS. Statistical methods in medical research, 4rd ed. London: Blackwell Science; 2002.
- [31] Hosmer DW, Lemeshow S. Applied Logistic Regression. New York: John Wiley & Sons; 1989.
- [32] Olinski R, Gackowski D, Foksinski M, Rozalski R, Roszkowski K, Jaruga P. Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic Biol Med* 2002;33:192-200.
- [33] Halliwell B. Effect of diet on cancer development: is oxidative dna damage a biomarker? *Free Radic Biol Med* 2002;32:968-74.
- [34] Chalasani N, Deeg MA, Crabb DW. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1497-502.
- [35] Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Aljada A, Garg R, Dandona P. Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am J Clin Nutr* 2002;75:767-72.
- [36] Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990;13:341-90.

- [37] Thompson HJ, Heimendinger J, Haegele A, Sedlacek SM, Gillette C, Neill CO, et al. Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage. *Carcinogenesis* 1999;20:2261-66.
- [38] Gerber M, Astre C, Ségala C, Saintot M, Scali J, Simony-Lafontaine J, et al. Oxidant-antioxidant status alterations in cancer patients: relationship to tumor progression. *J Nutr* 1996;126:1201S-07S.
- [39] Saintot M, Astre C, Pujol H, Gerber M. Tumor progression and oxidant-antioxidant status. *Carcinogenesis* 1996;17:1267-71.
- [40] Wander RC, Du SH. Oxidation of plasma proteins is not increased after supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Am J Clin Nutr* 2000;72:731-7.
- [41] Pitsavos C, Panagiotakos DB, Tzima N, Chrysohoou C, Economou M, Zampelas A, et al. Adherence to the Mediterranean diet is associated with total antioxidant capacity in healthy adults: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr* 2005;82:694-99.
- [42] Haldar S, Rowland IR, Barnett YA, Bradbury I, Robson PJ, Powell J, et al. Influence of habitual diet on antioxidant status: a study in a population of vegetarians and omnivores. *Eur J Clin Nutr* 2007;61:1011-22.
- [43] Lesgards JF, Durand P, Lassarre M, Stocker P, Lesgards G, Lanteaume A, et al. Assessment of lifestyle effects on the overall antioxidant capacity of healthy subjects. *Environ Health Perspect* 2002;110:479-86.
- [44] Miller ER, Erlinger TP, Sacks FM, Svetkey LP, Charleston J, Lin PH, et al. A dietary pattern that lowers oxidative stress increases antibodies to oxidized LDL: Results from a randomized controlled feeding study. *Atherosclerosis* 2005;183:175-82.
- [45] Young JF, Nielsen SE, Haraldsdóttir J, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, et al. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr* 1999;69:87-94.
- [46] Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003;333:19-39.
- [47] Kumaraguruparan R, Subapriya R, Kabalimoorthy J, Nagini S. Antioxidant profile in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast. *Clin Biochem* 2002;35:275-79.
- [48] Saygili EL, Akcay T, Konukoglu D, Papilla C. Glutathione and glutathione-related enzymes in colorectal cancer patients. *J Toxicol Environ Health A* 2003;66:411-15.
- [49] Buser K, Joncourt F, Altermatt HJ, Bacchi M, Oberli A, Cerny Th. Breast cancer: pretreatment drug resistance parameters (GSH-system, ATase, P-glycoprotein) in tumor tissue and their correlation with clinical and prognostic characteristics. *Ann Oncol* 1997;8:335-41.

[50] Zalani S, Bharaj BS, Rajalakshmi R. Ascorbic acid and reduced glutathione concentration of human fetal tissues in relation to gestational age, fetal size and maternal nutritional status. *Int J Vitam Nutr Res* 1987;57:411-9.

[51] Di GC, Acquaviva R, Lanteri R, Licata F, Licata A, Vanella A. Nonproteic antioxidant status in plasma of subjects with colon cancer. *Exp Biol Med* 2003;228:525-28.

[52] Szuster-Ciesielska A, Hryciuk-Umer E, Stepulak A, Kupisz K, Kandefer-Szerszen M. Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. *Acta Oncol* 2004;43:252-58.

CAPÍTULO 6

LIMITAÇÕES DO ESTUDO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maior limitação do presente estudo constitui o tamanho da amostra e a subsequente inabilidade para fazer declarações conclusivas sobre a relação causa-efeito entre os marcadores de estresse oxidativo e as variáveis examinadas nas mulheres com câncer de mama.

Apesar dos critérios estabelecidos para a seleção das participantes do estudo, há a possibilidade de ocorrência de possíveis vícios quanto à percepção de seu estado de saúde, além dos condicionantes que são acarretados pelo fato dos indivíduos participantes estarem sobre o estresse emocional pré-cirúrgico.

Outro fator potencialmente importante na introdução de vícios diz respeito à necessidade de recordação de fatos ocorridos há décadas passadas, como a idade à menarca e à primeira gestação, sobretudo nas mulheres mais velhas.

Neste estudo, a exclusão de mulheres com câncer de mama acima de 60 anos constituiu um importante vício de seleção, o que faz com que a validade externa do estudo fique comprometida. Neste caso, a avaliação do efeito da ingestão de grupos de alimentos sobre os marcadores de estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama, pode ter sido distorcida pelo vício de seleção, porque a frequência do consumo de alimentos pode ter sido artificialmente alterada. Por exemplo, as mulheres com idade acima de 60 anos provavelmente tem um padrão alimentar diferente do que as mais jovens, sendo assim, determinados alimentos que constituem fatores de risco para o aumento do estresse oxidativo podem não ter sido identificados nesse estudo.

Entretanto, uma vantagem importante foi que todas as etapas da pesquisa foram realizadas antes de qualquer tratamento para a doença, como cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou uso de tamoxifeno. Tem sido mostrado que o tratamento para a doença resulta em significantes alterações nas concentrações dos marcadores de estresse oxidativo em pacientes com câncer. Outra vantagem do nosso estudo foi a realização da coleta sanguínea e análises bioquímicas de acordo com procedimentos padrões, além disso, foram utilizados cinco marcadores do estado de estresse oxidativo.

O padrão de distribuição de variáveis reprodutivas, nutricionais e de estilo de vida observados neste estudo, pode ser categorizado, em seu conjunto, como de elevado risco para o desenvolvimento do câncer de mama. Conhecer o perfil dessas variáveis, em

pacientes com a doença, pode ser de grande valia na adoção de estratégias que objetivem modificar o padrão de distribuição dos fatores de risco associados a esta neoplasia.

A modificação de determinados fatores, tais como tabagismo, sobrepeso, obesidade, sedentarismo e dieta em mulheres com câncer de mama pode contribuir, significativamente, para melhorar a terapêutica clínica e reduzir o risco de recidiva da doença.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o consumo de frutas ricas em vitamina C, verduras crucíferas e leites e derivados, principalmente laticínios pobres em gordura podem contribuir para diminuir o estresse oxidativo.

Em contrapartida, os resultados apontam que o consumo de carnes processadas, óleos vegetais e gorduras de origem animal podem aumentar o estresse oxidativo.

Os resultados deste estudo sugerem também que a presença de linfonodos axilares comprometidos e a renda familiar acima de dois salários mínimos podem estar associados ao estresse oxidativo.

Os resultados da associação entre estresse oxidativo e as características analisadas podem contribuir para uma melhor compreensão do papel que essas variáveis exercem sobre o estresse oxidativo.

Recomenda-se futuros estudos para investigar o padrão de distribuição das variáveis relacionadas ao câncer de mama e a associação entre estas variáveis e o estresse oxidativo na população em geral.

APÊNDICES

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Resolução n. 196 de 10 de outubro de 1996, segundo o Conselho Nacional de Saúde

A Universidade Federal de Santa Catarina, através das pesquisadoras Patrícia Faria Di Pietro, professora do Departamento de Nutrição e Francilene Gracieli Kunradi, mestranda em nutrição, está desenvolvendo a pesquisa intitulada “**Avaliação do consumo alimentar e estresse oxidativo em relação ao câncer de mama em um estudo caso-controle no município de Florianópolis**”, realizada no Ambulatório de nutrição da Maternidade Carmela Dutra.

Os objetivos deste estudo são esclarecer a importância da alimentação no desenvolvimento do câncer de mama e investigar a relação entre o consumo alimentar e os níveis de estresse oxidativo em relação ao câncer de mama. Será aplicado um Questionário de avaliação clínica, socioeconômica e dietética, assim como realizado a avaliação antropométrica, através da verificação do peso e da altura. Para verificar os níveis de estresse oxidativo será feita coleta sanguínea por profissionais treinados da Maternidade Carmela Dutra.

O presente estudo não trará nenhum risco para sua integridade física ou moral. As informações coletadas serão úteis cientificamente para verificar a importância da alimentação no desenvolvimento do câncer de mama. Garantimos que as informações fornecidas serão utilizadas apenas neste trabalho sem a identificação das participantes. Sua participação é voluntária, podendo desistir a qualquer momento do estudo, sem qualquer consequência para você. Caso tenha alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato através do telefone (48) 3331-8014.

Eu, _____, fui esclarecida sobre a pesquisa “Avaliação do consumo alimentar e do estresse oxidativo em relação ao câncer de mama em um estudo caso-controle no município de Florianópolis-SC” e aceito participar livremente da mesma.

Florianópolis, ____ de _____ de 200_.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

Você faz uso de algum suplemento nutricional? 1: () Sim 2: () Não
Se sim, qual (ou quais)?
Menopausa 1: () Sim 2: () Não
Se sim, com que idade ocorreu a sua menopausa? _____
Foi por histerectomia? 1: () Sim 2: () Não
Se sim, você faz uso de reposição hormonal? 1: () Sim 2: () Não
Você realiza consulta ginecológica anualmente? 1: () Sim 2: () Não
Você realizou mamografia? 1: () Sim 2: () Não
Se sim, com que idade realizou a 1ª mamografia? _____ anos
Você pratica atividade física? 1: () Sim 2: () Não
Se sim, qual (ou quais)?
Quantas vezes por semana?
E quanto tempo por vez? _____ E há quanto tempo? _____
Você fuma? 1: () Sim 2: () Não Se sim, há quanto tempo?
Quantos cigarros por dia você fuma?
Se não, você já fumou? 1: () Sim 2: () Não
Se sim, por quanto tempo? _____ Quantos cigarros por dia você fumava?
<i>Etilismo?</i> 1: () Sim 2: () Não
Há alguém na sua família que tem (ou teve) CA de mama? 1: () Sim 2: () Não
Se sim, qual o seu grau de parentesco com esta pessoa? 1: () mãe 6: () prima 1º Grau 2: () filha 7: () tia 2º Grau 3: () avó 8: () prima 2º Grau 4: () irmã 9: () outros 5: () tia 1º Grau
Existe alguém em sua família que tem ou já teve outro tipo de câncer? 1: () Sim 2: () Não
Se sim, Qual o câncer?
Se sim, qual o seu grau de parentesco com esta pessoa? 1: () pai/mãe 6: () primo 1º Grau 2: () filho 7: () tio 2º grau 3: () avô/avó 8: () primo 2º grau 4: () irmão/irmã 9: () outros 5: () tio 1º Grau
Qual a renda mensal da família (em reais)? _____
Quantas pessoas moram com você? _____
Avaliação Nutricional
Peso: _____ Kg Altura: _____ m IMC: _____ Kg/m ²
Diagnóstico Nutricional:
Informações coletadas apenas para as pacientes com câncer de mama
Data do diagnóstico histopatológico: ____/____/____. Data da cirurgia: ____/____/____.
Grau de Estadiamento? 1:() Grau I 2:() Grau II 3:() Grau III 4:() Grau IV 5:() Grau V

APÊNDICE D

ALIMENTOS DE CADA GRUPO E SUBGRUPO ALIMENTAR

Grupo e Subgrupo Alimentar	Alimentos considerados
Cereais, tubérculos e raízes*	Todos os cereais inclusive os cereais de pastelaria
Cereais de pastelaria	Salgadinhos fritos e pizza
Verduras*	Todas as verduras*
Verduras crucíferas	Brócolis/ couve-flor, repolho e couve
Verduras ricas em carotenóides	Abóbora, cenoura e couve
Total de frutas*	Todas as frutas inclusive suco da fruta
Frutas ricas em vitamina C	Goiaba, kiwi, laranja, mamão, manga, melancia, morango e tangerina
Frutas ricas em carotenóides	Caqui e manga
Total de leguminosas*	Feijão e lentilha
Total de leites e derivados*	Todos os laticínios ricos e pobres em gordura
Laticínios ricos em gordura	Leite integral, iogurte, nata, queijo amarelo e queijo cremoso
Laticínios pobres em gordura	Leite desnatado e queijo branco
Total de carnes e ovos*	Todas as carnes
Carnes vermelhas	Carne bovina gorda e magra e carne suína gorda e magra
Peixes	Peixe frito, peixe assado e sardinha ou atum
Aves	Frango gordo e frango magro
Carnes processadas	Lingüiça, salsicha, presunto mortadela
Carnes gordurosas	Carne bovina gorda, carne suína gorda, frango frito e peixe frito
Carnes magras	Carne bovina magra, carne suína magra, frango magro e peixe assado
Total de óleos e gorduras*	
Gorduras de origem vegetal	Óleo vegetal, margarina, maionese e oleaginosa
Gorduras de origem animal	Bacon ou toucinho, banha de porco e manteiga
Total de açúcares e doces*	Todos os açúcares e doces

* De acordo com o Guia Alimentar para População Brasileira (BRASIL, 2006).

ANEXOS

ANEXO A

NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA FEMINA

Informações Gerais

1) Femina destina-se à publicação de artigos originais, de atualização, de revisão e outros expostos adiante. Os artigos devem ser acompanhados de carta de submissão assinada por todos os autores garantindo que o artigo é original, que nunca foi publicado e que a versão final foi lida e aprovada por todos os autores.

2) O número máximo de autores de cada manuscrito é de 7 (sete). A Editora Científica se reserva o direito, em casos especiais e selecionados, de permitir mais de 7 (sete) autores e mais de 25 (vinte e cinco) leituras suplementares, com exceção dos artigos de revisão sistemática.

Preparação do Original

1) O original deve ser impresso em folha tipo A4, branca, espaçamento duplo (inclusive tabelas), com amplas margens e encaminhado em 3 vias. Juntamente com os originais deverá ser enviada cópia em disquete. Processador de texto aceito: word for windows de qualquer versão, com tamanho de letra 12.

2) Femina é a revista da FEBRASGO tradicionalmente direcionada para publicação de artigos de Atualização e revisão em tópicos específicos da Ginecologia ou da Obstetrícia. Assim sendo, solicita-se dos autores a devida atenção às diretrizes abaixo:

Na página de rosto do trabalho colocar o título (com no máximo de 70 caracteres) do manuscrito em português e em inglês; nome completo dos autores, nome da instituição onde os autores atuam; endereço completo, telefone, fax e se houver e-mail, do autor principal para correspondência.

Na segunda página será apresentado o Resumo do Trabalho, com mínimo de 100 e máximo de 200 palavras. O texto será corrido, e sem subtítulos habituais. Em verdade haverá a seqüência acima sem ser explicitada, pois os trabalhos habitualmente são de atualização, sem casuística própria. Na mesma página do resumo colocar três palavras-chave para inclusão no índice da revista.

Na terceira página colocar o Abstract, versão fiel do Resumo. Colocar também as 3 Keywords com a mesma finalidade.

Na quarta página e subseqüentes terá início o “corpo” do trabalho. A seqüência será a de qualquer trabalho científico. Iniciar com Introdução breve, mostrando a atualidade, importância e interesse do tema estudado. Expor em seqüência o pensamento atual dos autores e estudo sobre o tópico analisado.

No final de cada tópico os autores poderão tecer considerações sobre o mesmo e a própria experiência. No final do trabalho, resumir os principais tópicos do estudo à guisa de considerações finais.

Os originais devem ser enviados à Secretaria Executiva da FEBRASGO (Av. das Américas, 8445 sala 711, Barra da Tijuca, RJ, CEP 22793-081).

ANEXO B

TABELA DE SAFRA DE ALIMENTOS

Safr de alimentos: frutas e verduras

PRODUTO	MESES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Abacate			*	*	*	*						
Abacaxi	*	*						*	*			*
Banana Prata					*	*	*	*	*	*		
Caqui		*	*	*								
Goiaba	*	*	*	*	*							
Laranja	*			*	*	*	*	*				
Limão	*	*	*	*	*	*						
Maçã	*	*	*	*								
Mamão				*	*	*	*				*	
Manga	*										*	*
Maracujá Azedo	*	*	*	*	*	*	*					
Melancia	*	*	*	*	*	*					*	*
Melão Amarelo	*	*	*				*	*				
Morango							*	*	*	*	*	
Pêra	*											
Tangerina/						*	*	*	*			
Uva	*	*										
Chicória	*							*	*	*	*	
Pimentão	*	*	*	*	*							
Abóbora	*	*	*	*	*	*	*	*				
Abobrinha	*	*	*	*	*							
Pepino	*	*	*	*								
Vagem	*		*	*	*					*	*	*
Quiabo	*	*	*	*	*							
Cenoura	*						*	*	*	*	*	*
Beterraba	*	*						*	*	*	*	*
Couve-flor								*	*	*		

Fonte: Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.agroportal.sp.gov.br/>.

ANEXO C

NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICIÓN

Información para los Autores

En 1950 el Instituto Nacional de Nutrición de Venezuela edita su revista Archivos Venezolanos de Nutrición, la cual en 1966 es donada a la recién creada Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN), para convertirse en su órgano oficial de divulgación Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN).

Archivos Latinoamericanos de Nutrición publica en tres idiomas: español, inglés y **portugués**, temas relacionados con alimentación y nutrición, entre ellos, ciencia y tecnología de alimentos, microbiología de alimentos, nutrición humana y animal, bioquímica nutricional aplicada, **nutrición clínica y comunitaria**, educación en nutrición y nutrición pública. También recoge las tendencias conceptuales, sociales y políticas, que marcan el rumbo general de la nutrición en países del continente americano y da a conocer las decisiones e iniciativas de instituciones y sociedades científicas, en función de promover y coordinar los esfuerzos de los países para mejorar la salud, la alimentación y la nutrición de sus habitantes.

ALAN publica editoriales, artículos originales, breves, y de revisión, conferencias, noticias, reseñas y cartas al editor. La extensión debe ser de **12 a 15 cuartillas (desde la portada hasta las referencias), más seis tablas y figuras (entre ambos) para artículos originales;** para los breves, cinco cuartillas más dos tablas o figuras (Ver Normas para la publicación de manuscritos).

Todos los artículos que se publican pasan por un proceso de arbitraje externo con dos especialistas. Para asegurar la confidencialidad, los trabajos se envían en forma anónima y los autores tampoco conocen la identidad de los revisores.

Archivos Latinoamericanos de Nutrición se reserva el derecho de aceptar o rechazar, de acuerdo con las recomendaciones del Comité Editorial, cada uno de los trabajos recibidos, así como de realizar cualquier corrección editorial que estime necesaria. El Comité Editorial no se hace responsable de los conceptos emitidos en los artículos aceptados para ser publicados y se reserva el derecho de no publicar los originales que no se ajusten a los lineamientos de la revista. ALAN se reserva los derechos de reproducción de los artículos seleccionados.

Archivos Latinoamericanos de Nutrición se acoge a las normas de los Requisitos Uniformes del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas (CIDRM), también conocido como el **Grupo de Vancouver**. **La versión oficial en inglés de este documento actualizado se puede hallar en: <http://www.icmje.org>.**

A continuación se presentan las recomendaciones específicas para *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* y se reproducen algunos aspectos relevantes, de los requisitos uniformes del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas (CIDRM) para la preparación de manuscritos que se presentan a las revistas biomédicas.

El texto de los artículos de observación y experimentales se divide en secciones que llevan estos encabezamientos: **introducción, métodos, resultados y discusión**. En los artículos largos puede ser necesario agregar subtítulos dentro de estas secciones, sobre todo en las de resultados y discusión, a fin de hacer más claro el contenido. Otros tipos de artículos -como las revisiones, ensayos y los editoriales- exigen otra estructura.

Para elaborar el manuscrito, mecanografiase en papel bond blanco de 216 x 280 mm o de la medida estándar ISO A4 (212 x 297 mm), con márgenes de por lo menos **25mm** (ALAN prefiere la medida de 216 x 280 mm). Escribise o imprímase solamente sobre una cara del papel. **Use doble espacio en todo el manuscrito, así como márgenes amplios.** Si los manuscritos se presentan en formato electrónico, los archivos deben venir a doble espacio. **Numere consecutivamente todas las páginas empezando con la portada.**

Página de la Portada

La portada debe llevar la siguiente información: 1) El título del artículo, conciso pero informativo; 2) Los nombres y la afiliación institucional de los autores; 3) El nombre de los departamentos e instituciones a los que debe atribuirse el trabajo; 4) Las cláusulas de descargo de responsabilidad, si las hubiera; 5) Los autores corresponsales. Hay que anotar el nombre, dirección postal, número de teléfono y de fax y dirección de correo electrónico del autor encargado de la correspondencia; 6) Nombre y dirección del autor a quien se dirigirán las solicitudes de separatas; 7) Procedencia del apoyo recibido en forma de subvenciones, equipo, medicamentos o todos ellos; 8) Titulillo, por lo común de menos de 40 pulsaciones (incluidos caracteres y espacios).

Título

El título debe limitarse a 10 palabras, de ser posible, y no exceder de 15. Debe describir el contenido de forma específica, clara y concisa. Hay que evitar los títulos y subtítulos demasiado generales y el uso de jerga y abreviaturas. Un buen título permite a los lectores identificar el tema fácilmente y ayuda a los centros de documentación a catalogar y clasificar el material. Colocar título en inglés en todos los artículos.

Autoría

Las personas designadas como autores son quienes hayan participado directamente en el trabajo, en grado suficiente para asumir responsabilidad pública por su contenido, en la concepción y el diseño o bien el análisis y la interpretación de los datos y en la redacción del artículo o la revisión crítica de una parte importante de su contenido intelectual. El orden en que figuran los autores debe reflejar una decisión conjunta de éstos. Las normas para la autoría se explican en extenso en el documento de Vancouver.

Resumen y palabras clave

Cada artículo se acompañará de un resumen de unas 250 palabras de extensión. En él indicaran los propósitos del estudio o investigación; los procedimientos básicos (selección de los sujetos o los animales de laboratorio incluidos en el estudio; métodos de observación y análisis); los hallazgos más importantes (datos específicos y su significación estadística), y las conclusiones principales.

A continuación del resumen agréguese, debidamente rotuladas, de 3 a 10 palabras o frases cortas clave. Utilicé para este propósito los términos de la lista "Medical Subject Headings" (MeSH) [Encabezamientos de materia médica] del Index Medicus, Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS)

En ALAN el artículo deberá acompañarse de un Resumen en inglés con sus palabras clave, "key words", si el trabajo original fuese en español o portugués. Si el trabajo original es en inglés, el Resumen y las palabras clave deben presentarse en español. El resumen deberá leerse corrido no en secciones.

Introducción

Proporcione el contexto o los antecedentes del estudio, es decir, la naturaleza del problema y su importancia. Enuncie la finalidad o el objetivo de investigación específico del estudio u observaciones. Mencione las referencias estrictamente pertinentes y no incluya datos ni conclusiones del trabajo que está dando a conocer.

Métodos

Describa claramente la forma como se seleccionaron los sujetos observados o que participaron en los experimentos (pacientes o animales de laboratorio, incluidos los testigos). **Identifique la edad, el sexo y otras características importantes de los sujetos.** Identifique los métodos, los aparatos y los procedimientos con detalles suficientes para que otros investigadores puedan reproducir los resultados. Proporcione referencias de los métodos acreditados, describa los métodos nuevos o que han sido sustancialmente modificados, manifestando las razones por las cuales se usaron y evaluando sus limitaciones. Identifique exactamente todos los medicamentos y productos químicos utilizados, sin olvidar nombres genéricos, dosis y vías de administración.

Los informes de ensayos clínicos aleatorizados deberán presentar información sobre todos los elementos importantes del estudio.

Ética. Cuando informe sobre experimentos en seres humanos, señale si los procedimientos seguidos estuvieron de acuerdo con las normas éticas del comité (institucional o regional) que supervisa la experimentación en seres humanos o con la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en 1983.

Estadística. Describa los métodos estadísticos con detalles suficientes para que el lector versado en el tema y que tenga acceso a los datos originales pueda verificar los resultados presentados. Siempre que sea posible, cuantifique los resultados y preséntelos con indicadores apropiados de error o incertidumbre de la medición

(por ej., intervalos de confianza). No dependa exclusivamente de las pruebas estadísticas de comprobación de hipótesis, tales como el uso de los valores P, que no transmiten información sobre la magnitud del efecto. Proporcione los detalles del proceso de aleatorización. Especifique cualquier programa de computación de uso general que se haya empleado.

Resultados

En el texto, las tablas y las ilustraciones, presentan los resultados siguiendo una secuencia lógica. No repita en el texto todos los datos de las tablas ni de las ilustraciones; destaque o resuma tan solo las observaciones importantes.

Al resumir los datos en la sección de resultados, facilite los resultados numéricos no solo como derivados (por ej., porcentajes), sino también como los números absolutos a partir de los cuales se calcularon los derivados, y especifique los métodos estadísticos mediante los cuales se analizaron. Limite las tablas y las figuras al número necesario para explicar el argumento del artículo y evaluar los datos en que se apoya. Use gráficas figuras en vez de tablas subdivididas en muchas partes; no duplique los datos en las figuras y las tablas. Las normas para Los resultados se explican en extenso en el documento de Vancouver.

Discusión

Haga hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio y en las conclusiones que se derivan de ellos. No repita con pormenores los datos u otra información ya presentados en las secciones de introducción y de resultados. Explique en la sección de discusión el significado de los hallazgos y sus limitaciones, incluidas sus implicaciones para la investigación futura. Relacione las observaciones con otros estudios pertinentes.

Establezca el nexo entre las conclusiones y los objetivos del estudio, pero absténgase de hacer afirmaciones generales y extraer conclusiones que no estén completamente respaldadas por los datos. Proponga nuevas hipótesis cuando haya justificación para ello, pero identificándolas claramente como tales.

Agradecimientos

Todos los colaboradores que no satisfagan los criterios de la autoría deben mencionarse en la sección de agradecimientos.

Dado que los lectores pueden inferir que dichas personas respaldan los datos y las conclusiones, todas ellas deben otorgar su permiso por escrito para que se les mencione en los agradecimientos.

Referencias

Numere las referencias consecutivamente siguiendo el orden en que se mencionan por primera vez en el texto. En este, en las tablas y en los pies o epígrafes de las ilustraciones, las referencias se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis. Las referencias citadas solamente en tablas o ilustraciones se numerarán siguiendo una secuencia que se establecerá por la primera mención que se haga en el texto de esa tabla o esa figura en particular.

Emplee el estilo que la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos usa en el Index Medicus. Abrevie los títulos de las revistas de conformidad con el estilo utilizado en dicha publicación. Consulte la List of Journals Indexed in Index Medicus [Lista de revistas indizadas en Index Medicus]. La lista se puede obtener en el sitio que la biblioteca mantiene en la World Wide Web <http://www.nlm.nih.gov/>

Absténgase de utilizar los resúmenes como referencias. Las referencias a artículos que han sido aceptados pero que todavía no se publican se designarán como "en prensa" o "de próxima aparición"; los autores obtendrán por escrito el permiso para citar dichos artículos y también la verificación de que han sido aceptados para publicación. La información proveniente de manuscritos presentados para publicación pero aún no aceptados se citará en el texto como "observaciones inéditas", con el permiso correspondiente de la fuente por escrito.

No cite una "comunicación personal" a menos que aporte información esencial que no pueda obtenerse de una fuente pública; en ese caso, el nombre de la persona y la fecha de la comunicación aparecerán entre paréntesis en el texto. Para reducir al mínimo los errores, los autores deben cotejar las referencias contra los documentos originales.

Para conocer muestras de los formatos de citación de las referencias, los autores deben consultar el siguiente sitio web: <http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform-requirements.html>.

Tablas

Mecanografíe o imprima cada tabla a doble espacio y en hoja aparte. Numérelas consecutivamente siguiendo el orden en que se citan por primera vez en el texto, y asigne un título breve a cada una. Cada columna llevará un encabezamiento corto o abreviado. Las explicaciones irán como notas al pie y no en el encabezamiento. En las notas al pie se explicarán todas las abreviaturas no usuales empleadas en cada

cuadro. Como llamadas para las notas al pie, utilícese los símbolos siguientes en la secuencia que se indica: *, †, ‡, ††, †††, ††††.

Identifique las medidas estadísticas de variación, tales como la desviación estándar y el error estándar de la media. No trace líneas horizontales ni verticales en el interior de las tablas. Cerciórese de que cada tabla aparezca citada en el texto.

Si incluye datos publicados o inéditos provenientes de otra fuente, obtenga la autorización necesaria para reproducirlos y conceda el reconocimiento que corresponde. Incluya sólo el número de tablas indispensables, el uso excesivo en relación con la extensión del texto, puede ocasionar dificultades al confeccionar las páginas.

Ilustraciones (figuras)

Las figuras estarán dibujadas y fotografiadas en forma profesional; no se aceptarán los letreros trazados a mano o con máquina de escribir. En lugar de los dibujos, radiografías y otros materiales de ilustración originales, envíe impresiones fotográficas en blanco y negro, bien contrastadas, en papel satinado y que midan 127 x 173 mm, sin exceder de 203 x 254 mm. Las letras, números y símbolos serán claros y uniformes en todas las ilustraciones; tendrán, además, un tamaño suficiente para que sigan siendo legibles incluso después de la reducción. Los títulos y las explicaciones detalladas se incluirán en los pies o epígrafes, no sobre las propias ilustraciones.

Al reverso de cada figura pegue una etiqueta de papel que lleve anotados el número de la figura, el nombre del autor y cuál es la parte superior de la misma.

Las fotomicrografías incluirán en sí mismas un indicador de la escala. Los símbolos, flechas y letras usados en estas deberán contrastar claramente con el fondo.

Si se usan fotografías de personas, estas no deberán ser identificables; de lo contrario, habrá que anexar un permiso por escrito para poder utilizarlas.

Las figuras se numerarán en forma consecutiva de acuerdo con su primera mención en el texto.

Pies o epígrafes de las ilustraciones

Los pies o epígrafes de las ilustraciones se mecanografiarán o imprimirán a doble espacio, comenzando en hoja aparte e identificándolos con los números arábigos correspondientes. Cuando se utilicen símbolos, flechas, números o letras para referirse a ciertas partes de las ilustraciones, será preciso identificar y aclarar el significado de cada uno en el pie o epígrafe. En las fotomicrografías habrá que explicar la escala y especificar el método de tinción.

Unidades de medida

Las medidas de longitud, talla, peso y volumen se expresarán en unidades del sistema métrico decimal (metro, kilogramo, litro, etc.) o sus múltiples y submúltiplos.

Las temperaturas se consignarán en grados Celsius. Los valores de presión arterial se indicarán en milímetros de mercurio.

Todos los valores hemáticos y de química clínica se presentarán en unidades del sistema métrico decimal y de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).

Abreviaturas y símbolos

Utilice únicamente abreviaturas corrientes. Evite las abreviaturas en el título y el resumen. Cuando se emplee por primera vez una abreviatura en el texto, deberá ir precedida del término completo, salvo si se trata de una unidad de medida común.

Envío del manuscrito a la revista

Se sugiere que los autores presenten el manuscrito elaborado en *Microsoft Word*. Si el autor no tiene acceso a correo electrónico puede mandar el manuscrito original, tres fotocopias y un disco con el texto completo a la dirección postal. El manuscrito irá acompañado de una carta de envío firmada por todos los autores.

ANEXO D

NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA NUTRITION

Guide for Authors

Nutrition provides an international forum for professionals interested in the **applied and basic biomedical nutritional sciences, and publishes papers both of clinical interest and of scientific import.** Investigators are encouraged to submit papers in the disciplines of nutritionally related biochemistry, genetics, immunology, metabolism, molecular and cell biology, neurobiology, physiology, and pharmacology. Papers on nutrition-related plant or animal sciences which are not of direct relevance to man, whereas occasionally of interest are not the main focus of the Journal.

CONDITIONS OF PUBLICATION — ETHICAL AND LEGAL

CONSIDERATIONS

All material submitted to *Nutrition*, for any section of the journal, is considered for publication on the understanding that authors (including all coauthors) agree to *Nutrition's* publication policies as stated in this section of the Guidelines to Authors.

In the event of non-compliance with these conditions of publication, including issues that surface after a contribution is published, *Nutrition's* rights include: sending a notice of failure to comply to authors' employers and funding agencies; and/or informing readers via a published correction/retraction; the latter is linked to the original contribution via electronic indexing and becomes part of the formal published record.

Research/publication misconduct is a serious breach of ethics. Such misconduct includes:

- i) Redundant or duplicate publication by same author(s),
- ii) Publication in another source by the same author(s) without acknowledgement or permission from the publisher, or
- iii) Plagerism or self-plagiarism (publication of material without acknowledging original author source).
- iv) Fabrication of data, not substantiable via review of research records.

Should such publications occur, editorial action would be taken. In certain cases, secondary publication is justifiable and even beneficial; however, such circumstances should be prospectively discussed with and agreed upon by the Editor-In-Chief.

Nutrition will not accept a submission of work previously reported in large part in a published article (duplicate) or that is contained in another paper submitted or accepted for publication in *Nutrition* or elsewhere.

Authorship

Corresponding Author: One author is designated the corresponding author (not necessarily the senior author) who will be approached to clarify any issues, such as those pertaining to materials and methods, or technical comments. If *Nutrition* receives feedback from its readers concerning the published paper, the corresponding author will be contacted. It is this author's responsibility to inform all coauthors of such matters to ensure they are dealt with promptly.

The corresponding author must affirm in the cover letter at the time of submission that:

1. None of the material in the manuscript is included in another manuscript, has been published previously, or is currently under consideration for publication elsewhere. This includes symposia proceedings, transactions, books, articles published by invitation, and preliminary publications of any kind except an abstract of less than 250 words. If there is any question concerning potential overlap, the related material must be included for evaluation.
2. Ethical guidelines were followed by the investigator in performing studies on humans or animals and should be described in the paper. The approval of the institutional review board of either animal or human ethics committee must be cited in the Methods.
3. Each author must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content of

the paper and must approve of the final version of the manuscript. Authorship should be based on substantive contributions to each of the following: conception and design of the study; generation, collection, assembly, analysis and/or interpretation of data; and drafting or revision of the manuscript; approval of the final version of the manuscript. Authors are required to include a statement in the Acknowledgements to specify the actual contribution of each coauthor under the above headings.

4. If requested, the authors will provide the data or will cooperate fully in obtaining and providing the data on which the manuscript is based for examination by the editors or their assignees

Conflict of Interest

Conflict of interest regarding a manuscript exists when a participant in the peer review and publication process—author, reviewer, or editor—has ties to activities that could inappropriately influence his or her impartial judgment, whether or not judgment is in fact affected. Financial relationships with industry are usually considered to be the most important conflicts of interest. However, conflicts can occur for other reasons, such as personal relationships or academic competition. See [Competing Interest Form](#) for instructions about the competing interests statement.

CATEGORIES OF MANUSCRIPTS

Nutrition publishes a wide range of articles, which includes original investigations, review articles, rapid communications, research letters, case reports and special category manuscripts. Manuscripts must be prepared in accordance with the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" developed by the International Committee of Medical Journal Editors (*N Engl J Med* 1991;324:424-428). All submissions are peer reviewed.

Original Investigations (4,000-6000 words)

Original investigations are considered full-length applied (human) or basic (bench work) research reports. They cover topics relevant to clinical and basic studies relevant to man in the following areas nutritionally related biochemistry, genetics, immunology, metabolism, molecular and cell biology, neurobiology, physiology, and pharmacology. Studies in adult and pediatric populations are welcome. The work presented in the manuscript must be original; studies confirming previous observations will be considered. Other considerations of a paper's publishability are its importance to the science, the soundness of the experimental design, the validity of methods, the appropriateness of the conclusions and the quality of presentation.

Rapid Communications: (3000 words including tables, figures, and references)

Papers representing concise and original studies of scientific importance are considered. In the cover letter the author should justify the request for Rapid Communication. The review process is 10 days, authors are allowed one revision if accepted, and the final version of the paper appears in the next available issue of the journal.

Research Letters: (1000 words, up to 10 references and 1 figure or table)

A Research Letter contains new data or a clinical observation, in a format that allows for rapid publication.

Review articles (6000 words)

In-depth, comprehensive state of the art reviews on a nutritional topic are welcomed. Reviews may be invited by the Editor or may be unsolicited viewpoints.

Case Reports (2,500 words)

Case Reports include case studies of 4 or fewer patients that describe a novel situation or add important insights into mechanisms, diagnosis or treatment of a disease.

Editorials

Editorials express opinions on current topics of interest, or provide comments on papers published in *Nutrition* or other journals. Editorials are generally solicited by one of the Editors.

Correspondence (Letters to the Editor) (1000 words including references)

Opinion pieces concerning papers published in *Nutrition* are particularly welcomed and all submissions are subject to editing. Letters commenting on past-published papers are sent to the corresponding author for a response. Letters are selected for their relevance and originality; not all letters submitted can be published.

Reports of meetings (2700 words)

Reports of meeting proceedings are synopses of scientific meetings of interest to Nutrition's audience. Authors should e-mail the Editor to solicit potential interest 8 weeks prior to conference.

Collections of abstracts, representing the proceedings of organizational meetings are not subjected to customary peer review. It is the view of the editorial board that it is of service to the nutrition community to present such material as promptly as possible.

PREPARATION OF MANUSCRIPT

Manuscripts must be written in English. Prior to submission, it is mandatory that authors have the manuscript evaluated and edited by a native English speaker. The layout and style should adhere strictly to the instructions given under

PREPARATION OF MANUSCRIPT**Cover Letter (see AUTHORSHIP)**

The cover letter should make it clear that the final manuscript has been seen and approved by all authors and that they have taken due care to ensure the integrity of their work and their personal scientific reputation. Any potential conflicts of interest should be declared, in addition to any information on prior or duplicate publication (see **Ethical and Legal Considerations**).

Authors must recommend five potential referees, at least three of whom should be from outside the country of the principal author, together with their e-mail addresses. While *Nutrition* does not guarantee these reviewers will be called upon, these suggestions may facilitate the editorial decision. It is Nutrition's experience that friends are the harshest critics while investigators in the same field are the most objective. Also include any person(s) who should not be considered a potential reviewer.

SUBMISSION PROCEDURE - PREPARING ELECTRONIC MANUSCRIPTS

As of 15 March 2005 all new manuscripts must be submitted through Nutrition's online submission and review Web site (☞ <http://ees.elsevier.com/nut/>). Use the following guidelines to prepare your submission. Via the "Author Gateway" page of this journal you will be guided stepwise through the creation and uploading of various files. Once the uploading is done, the system automatically generates an electronic (PDF) proof (which is then used for reviewing). The corresponding author will be informed via e-mail that a PDF of the submission has been created and that approval is required from the corresponding author to begin the review process. Be sure to keep a backup copy of your paper for reference and safety. All correspondence should be with the Regional Editorial Offices. If a paper is accepted, the Production Office will correspond with the author via e-mail.

For online submission authors are requested to submit the text, tables and artwork in separate documents in electronic form to ☞ <http://ees.elsevier.com/nut/> . In an accompanying cover letter, authors should state that the manuscript, or parts of it, have not been and will not be submitted elsewhere for publication.

Text files should be supplied in one of the following formats: Microsoft Word Windows or Macintosh formatted. Format your paper (tabs, indents, etc.) consistently. Once a manuscript has been accepted, most formatting codes will be removed or replaced so there is no need to use excessive layout styling. Do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering. However, do use bold face, italic, subscripts, and superscripts for scientific nomenclature.

When preparing tables, if you are using a table grid, please use only one grid for each separate table and not a grid for each row. If no grid is being used, use tabs to align columns, not spaces.

Graphic files: see Artwork Instructions under Instructions for Authors on *Nutrition's* website within Science Direct for guidelines for preparing electronic artwork: (Note: Only TIFF, EPS, or PDF formats are acceptable formats). Each figure should be a separate file and not be embedded in the text. All graphic files must be submitted in sufficiently high resolution (300dpi for grayscale or color images and 600-1000 dpi for line art) to allow for printing.

PREPARATION OF MANUSCRIPT

Manuscripts should be typewritten, using DOUBLE SPACING and 1-inch margins. Pages should be numbered consecutively starting with the title page.

Title Page

This should include 1) title of paper (**use no abbreviations, limit: 120 characters with spaces**), 2) running head of fewer than 55 characters with spaces, 3) full names of all authors with highest academic degree(s); 4) affiliations of all authors; 4) role of each author in the work (see Authorship); 5) a word count for the entire manuscript (including figures and tables), and the number of figures and tables, 4) the complete mailing address (including telephone, fax, and e-mail address of the corresponding author for e-mailing of proofs and reprint requests).

Acknowledgments

Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining permission of everyone acknowledged by name. If the name of the individual performing statistical consultation is not included with authors, acknowledgment must include name and degree of statistician. Acknowledge all funding and material support, both direct and indirect for the work represented by the manuscript; include commercial, institutional, and other forms of support.

Abstract

Abstracts should be no more than **250 words**, in accordance with Medline limitations. The structured abstract for an original investigation should be organized as follows:

Objective. The abstract should begin with a clear statement of the precise objective or question addressed in the paper. If a hypothesis was tested, it should be stated.

Research Methods & Procedures. The basic design of the study and its duration should be described. The methods used should be stated, the statistical data/methods provided and referenced.

Results: The main results of the study should be given in narrative form. Measurements or other information that may require explanation should be defined. Levels of statistical significance should be indicated, including other factors crucial to the outcome of the study.

Conclusion(s) State only conclusions that are directly supported by the evidence and the implications of the findings.

Key Words: 5—7 key words or phrases should be provided which should be selected from the body of the text and not duplicate title words.

Structure of Text

Introduction: Context of study.

Materials and Methods: Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference; only relevant modification should be described.

Results: These should be clear and concise and not duplicate data in Tables.

Discussion: This should be relevant to the results and placed in context of the current literature.

Conclusion: (no longer than 50 words) Summarize your findings.

References

References are numbered sequentially in the order in which they first appear in the text in square brackets. All references cited in the text should be listed at the end of the manuscript on a separate page. All items in the reference list should be cited in the text and conversely, all references cited in the text must be presented in the list. The Journal has adopted the Vancouver style, citing the first six authors and then adding et al. and uses page ranges.

References to periodicals should be as follows: name and initials of authors, title of paper, abbreviated journal title (conforming to those used in *Index Medicus*), year, and first and last pages of the article.

Book references should be as follows: author, initials, title of book, title of series and volume number (if applicable), publisher and city, and year.

Multi-author books or to proceedings printed in book form should be similar to those for monograph books.

Article

Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;266:497-509.

Article in Book

Johnson RK. Energy. In: Mahan LK, Escott-Stump S, editors. Krause's food, nutrition & diet therapy. 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2000, p. 19-30.

Book

Kline P. The handbook of psychological testing. London: Routedledge; 1993.

The authors are responsible for the accuracy, relevance, and completeness of each reference.

For references to articles in press, supply the name of the journal. References to unpublished material, including written (not verbal) personal communications, should be included parenthetically in the text with investigators' names and initials.

Figures

Legends to Figures: Figure legends should be concise and clear and should not duplicate the body of the text. Each illustration must have a title and an explanatory legend. The title should be part of the legend and not be reproduced on the figure itself. The legends should be placed on a separate page at the end of the manuscript and begin with the number of the illustration they refer to. All symbols and abbreviations used in the figure including statistical information must be explained.

Figures and other graphic material: May be formatted in any common file format, such as TIFF, GIF, JPG, or BMP as long as quality and resolution are borne in mind.

All material submitted must have been originally produced with proportions that will remain legible when reduced to the width of a one-half page column in the final publication (Column width: 20 picas, 3 $\frac{1}{3}$ ", 8.3 cm). Text font size should be consistent both within each figure and among all figures in the document.

Authors are responsible for applying for permission for both print and electronic rights for all borrowed materials and are responsible for paying any fees related to the applications of these permissions.

Color Reproduction: If a manuscript containing color figures undergoes peer review and acceptance, it must be published with color figures. Authors are required to pay for the printing of color figures (\$650 for the first figure in an article, \$100 for every additional figure in the article).. If the author does not wish to pay for printing color figures, then the manuscript's figures must be in black and white at the time of submission and during the review process.

Tables

These should be typed double-spaced with each table on a separate page. Legends should contain sufficient information to provide an adequate understanding of the table by the reader without reference to the text.

Copyright

Publications are made subject to copyright for the protection of the authors and the publisher. A Transfer of Copyright Agreement will be sent to the corresponding author along with the page proof. The form must be completed and returned to the publisher before the article can be published.