

ARTIGO DE REVISÃO

Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos

Bruna Karoline França^{a,*}, Maria Rosa Melo Alves^b, Fernanda Maria Silveira Souto^a, Larissa Tiziane^a, Raquel Freire Boaventura^b, Adriana Guimarães^b e Antonio Alves Jr^{a,c}

^a Departamento de Medicina, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE, Brasil

^b Departamento de Biomedicina Universidade Tiradentes (UNIT), Aracaju, SE, Brasil

^c Serviço de Cirurgia Bariátrica, Hospital Universitário (HU), Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE, Brasil

Recebido a 28 de junho de 2012; aceite a 14 de abril de 2013

Disponível na Internet a 4 de outubro de 2013

PALAVRAS-CHAVE

Estresse oxidativo;
Peroxidação lipídica;
Biomarcadores;
Obesidade

Resumo A obesidade é uma doença cada vez mais comum, cuja prevalência já atinge proporções epidêmicas, por estar associada a inúmeras doenças crônicas tem sido alvo de muitas pesquisas. O estresse oxidativo, aferido pela peroxidação lipídica no plasma, é apontado como alteração marcante na obesidade; sendo, portanto, um distúrbio que deve ser detalhadamente estudado a fim de elucidar possíveis abordagens para essa condição. O objetivo desta revisão é apresentar métodos que comprovam o aumento do estresse oxidativo na obesidade e sua influência nas comorbidades do obeso.

© 2012 Sociedade Portuguesa de Gastrenterologia. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos os direitos reservados.

KEYWORDS

Oxidative stress;
Lipid peroxidation;
Biomarkers;
Obesity

Lipid peroxidation and obesity: Methods to measure the oxidative stress of the obese paciente's plasma

Abstract Obesity is an increasingly common disease, which prevalence has reached epidemic proportions, and extensive research has been done in many researches because of the association with many is associated with many important chronic diseases. Oxidative stress, measured through lipid peroxidation in plasma, has been pointed as a remarkable changing in obesity, and therefore, a disorder that should be thoroughly studied in order to elucidate possible approaches to this condition. The objective of this review is to present methods which confirm the increased oxidative stress in obesity and its influence on the comorbidities of the obese.

© 2012 Sociedade Portuguesa de Gastrenterologia. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Autor para correspondência.

Correio eletrónico: bpfranca@yahoo.com.br (B.K. França).

Introdução

A obesidade é uma doença que tem alcançado proporções alarmantes em todo o mundo e é um importante fator de risco para o desenvolvimento de diversas comorbidades de elevada morbidade e mortalidade como diabetes mellitus, dislipidemia, aterosclerose, hipertensão arterial, resistência à insulina, esteatose hepática, doença hepática não alcoólica entre outras¹⁻⁵. Nos pacientes obesos há diversos fatores que interferem na suscetibilidade do indivíduo à presença do excesso de lesões oxidativas contribuintes para as comorbidades. Dentre eles se destacam a hiperglicemia, a atividade muscular aumentada, os níveis elevados de lipídios teciduais, a inflamação crônica, as defesas antioxidantes inadequadas e a hiperleptinemia. Vários estudos mostram ainda, acúmulo de subprodutos da peroxidação lipídica no plasma de pacientes obesos⁶⁻⁸, no entanto são escassos na literatura artigos que versem sobre os mecanismos específicos envolvidos nesse processo.

A cirurgia bariátrica tem se mostrada como o método mais efetivo para o tratamento e a profilaxia das complicações causadas pela obesidade mórbida, já tendo sido bem demonstrada a eficácia e a segurança dos procedimentos cirúrgicos bariátricos em aumentar a longevidade e a qualidade de vida dos obesos mórbidos. A cirurgia é realizada para o tratamento das comorbidades relacionadas à obesidade mórbida, sendo a gastroplastia com «bypass» em Y de Roux, considerado o procedimento mais efetivo e recomendado como padrão ouro de tratamento⁹. Alguns trabalhos demonstram o impacto da cirurgia bariátrica sobre a redução do estresse oxidativo no paciente obeso, melhorando as comorbidades advindas do excesso de radicais livres e peroxidação lipídica existente na obesidade¹⁰.

Devido à escassez de artigos que detalhem os mecanismos relacionados às lesões oxidativas no indivíduo obeso, esse artigo possui a importância de apresentar as vias de aumento de estresse oxidativo e sua mensuração. Assim, tal fato pode permitir a realização de pesquisas futuras e a descoberta de intervenções nesses mecanismos que sabidamente predispõem às comorbidades desses pacientes.

Estresse oxidativo e lipoperoxidação

A peroxidação lipídica constitui uma reação em cadeia dos ácidos gordos polinsaturados das membranas celulares, gerando radicais livres que alteram a permeabilidade, fluidoza e integridade das mesmas^{11,12}. Esses danos celulares, que se encontram aumentados nos indivíduos obesos, predispõem às comorbidades já citadas, como hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, eventos tromboembólicos, diabetes mellitus, além de neoplasias¹³⁻¹⁶.

No entanto, a geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico. Eles são necessários para que funções como a sinalização celular e a defesa contra micro-organismos ocorram de maneira adequada. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de eletrões nas várias reações bioquímicas. Porém, a produção excessiva pode conduzir a lesões oxidativas¹⁷. Estes radicais livres, cujo eletrão desemparelhado se encontra centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de

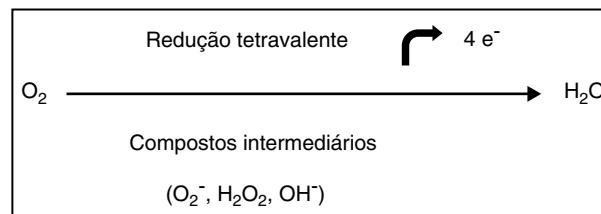


Figura 1 Redução tetravalente da molécula de O_2 . Formação de compostos intermediários, espécies reativas ao oxigênio (ROS), como O_2^- (ânion superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), OH^- (radical hidroxila). (Fonte: Franco³⁸).

oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), respectivamente^{18,19} (fig. 1).

As ERO são produtos instáveis, decorrentes da redução tetravalente sofrida pela molécula de oxigênio, aceitadora final de eletrões, durante a produção de energia na etapa de fosforilação oxidativa²⁰ (fig. 1). As principais ERO distribuem-se em 2 grupos, os radicalares: hidroxila (HO^\bullet), superóxido ($O_2^\bullet-$), peroxila (ROO^\bullet) e alcoxila (RO^\bullet); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO^\bullet), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$)²¹. Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando apenas lipídios, outros são reativos com esses e com proteínas e DNA. Na tabela 1 estão representadas algumas características das espécies radicalares mais importantes.

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidant, que têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes¹⁷.

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos²².

Os antioxidantes, sejam naturais ou sintéticos, possuem elevada estabilidade oxidativa em função de sua estrutura molecular e, por isso, desempenham papel fundamental na prevenção da oxidação resultante da ação dos radicais livres²³. Os sistemas antioxidantes existem sob a forma de compostos enzimáticos e não enzimáticos. O sistema antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GSH-PX), glutationa redutase (GSH-Rd) e a catalase (CAT). Estas enzimas são responsáveis pela remoção do ânion superóxido (O_2^-), hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente^{19,24}. Já o sistema antioxidante não enzimático relaciona-se com um grupo de antioxidantes que podem ser congregados em compostos produzidos *in vivo*, como é o caso da glutationa, da ubiquinona e do ácido úrico, e em compostos obtidos diretamente da dieta tais como o α -tocopherol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-c), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonoides e

Tabela 1 Características das espécies radiculares

Espécies reativas	Características
Ânion-radical superóxido $O_2^{\bullet-}$	Gerado continuamente por diversos processos celulares. Em solução aquosa é um forte agente redutor. É permeável a membranas e em fagócitos, como neutrófilos e macrófagos, é um dos microbicidas mais importantes
Peróxido de hidrogênio H_2O_2	Intermediário formado pela reação de dismutação de $O_2^{\bullet-}$ – catalisada pela enzima SOD, pela redução de 2 e^- na molécula de O_2 e pela ação de diversas enzimas oxidases <i>in vivo</i> , localizadas nos peroxissomas. É um fraco agente oxidante e um fraco agente redutor, mas produz danos celulares quando produzidos em excesso
Radical hidroxila $\bullet OH$	É o mais reativo e mais lesivo radical conhecido e para o qual, uma vez formado, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa. É capaz de reagir com uma série de endobióticos, modificar o DNA, inativar enzimas e causar danos a proteínas e gerar peroxidação lipídica. Possui, contudo, âmbito limitado de ação (poucos diâmetros moleculares)
Radicais peroxila (RO_2^{\bullet}) e alcoxila ($RO^{\bullet-}$)	Formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, como na peroxidação lipídica
Oxigênio singlete $1O_2^*$	Estado eletronicamente excitado do oxigênio, produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações que reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídios da membrana, iniciando processos de peroxidação
Ozônio O_3	Produzido no ar atmosférico poluído e por fontes de luz intensa de algumas fotocopiadoras e outros equipamentos. É extremamente lesivo para o pulmão, oxidando rapidamente proteínas, DNA e lipídios
Óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio $NO\bullet$	Sintetizado nos organismos vivos pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que converte o aminoácido L-arginina a $NO\bullet + L$ -citrulina. É um radical abundante que age em vários processos biológicos, incluindo relaxamento muscular, neurotransmissão e regulação imune. Potente vasodilatador, envolvido na regulação da pressão arterial. Quando exposto ao ar, reage com oxigênio para formar NO_2^{\bullet}
Dióxido de nitrogênio NO_2	Potente iniciador da peroxidação lipídica em fluidos biológicos
Peroxinitrito $ONOO^-$	Instável, tempo de vida curto, oxidante potente, propriedades semelhantes ao radical hidroxila, causa danos a muitas moléculas biológicas além de ser capaz de formar $\bullet OH$

Fonte: Vasconcelos et al.²⁷

poliflavonoides^{20,26}. Na tabela 2 estão representados os antioxidantes enzimáticos e os antioxidantes não enzimáticos

O desequilíbrio entre os sistemas antioxidante e pró-oxidante, com predomínio da ação oxidante e dano consequente, resulta no estresse oxidativo^{23,25-27}. Este promove alterações como peroxidação lipídica, fragmentação de DNA e oxidação de diferentes moléculas, levando à morte celular¹⁷. Alguns estudos têm demonstrado métodos

capazes de quantificar os níveis de estresse oxidativo no plasma^{12,13,15}.

Obesidade e estresse oxidativo

Os pacientes obesos comumente possuem um desequilíbrio entre gordura, peso corporal, lipoproteínas e lipídios, o que interfere na suscetibilidade do organismo a lesões oxidativas.

Sabe-se que existem pelo menos 3 mecanismos através dos quais a obesidade pode produzir peroxidação lipídica²⁸. A obesidade aumenta a necessidade metabólica do miocárdio, com o consequente aumento do consumo de oxigênio. Com isso, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como os superóxidos e os peróxidos de hidrogênio aumenta devido à maior respiração mitocondrial. Se a produção dessas espécies de oxigênio exceder a capacidade antioxidante da célula, o estresse oxidativo pode ocorrer, resultando em peroxidação lipídica²⁹. O segundo mecanismo através do qual a obesidade pode aumentar a peroxidação lipídica é através da lesão celular progressiva e cumulativa devido à pressão pela grande massa corporal. A injúria celular, por

Tabela 2 Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos

Antioxidantes enzimáticos	Antioxidantes não enzimáticos
Glutationa peroxidase (α -tocoferol, β -tocoferol)	Vitaminas lipossolúveis
Catalase	Ácido ascórbico
Metionina-redutase (Zinco, cobre, selênio, magnésio)	Oligoelementos
Superóxido-dismutase	Flavonoides

Fonte: Franco³⁸.

sua vez, libera citocinas como o fator de necrose tumoral que gera espécies reativas de oxigênio³⁰. Um último mecanismo proposto é que através de uma dieta hiperlipêmica se altere o metabolismo do oxigênio, pois as moléculas dos ácidos gordos com duplas ligações são vulneráveis a reações oxidativas e consequentemente podem levar a peroxidação lipídica³¹.

Em crescente discussão na literatura é a hipótese de que a obesidade «*per se*» causa aumento da peroxidação lipídica plasmática e diminuição das enzimas citoprotetoras eritrocitárias³². O estudo de Olusi (2002), com o objetivo de confirmar essa hipótese, avaliou a peroxidação lipídica e a citoproteção eritrocitária através da medida das concentrações plasmáticas do malondialdeído (p-MDA) e da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GPX) em pacientes obesos sem outras comorbidades. Esse estudo chegou à conclusão que a obesidade, mesmo não associada ao tabagismo, à diabetes mellitus, à hipertensão arterial, à hiperlipidemia, a doenças renais ou hepáticas está relacionada ao aumento da peroxidação lipídica e à diminuição da atividade de enzimas citoprotetoras, e deve, portanto, receber a mesma atenção que a obesidade associada a complicações²⁸. A consequência de uma baixa atividade de enzimas citoprotetoras é o dano celular progressivo que pode levar a aterosclerose, ao cancro e a outras doenças.

Diversas medidas como intervenções farmacológicas e cirúrgicas, prática de atividades físicas para redução do peso, restrição calórica e mudanças comportamentais têm sido propostas para o tratamento da obesidade e consequente redução do estresse oxidativo. Terapia com antioxidantes, desde que em dose e tempo de tratamento adequado, também parece válida. Todas essas intervenções favorecem a perda de peso que se associa a uma redução na produção de espécies oxidantes e a uma melhor capacidade antioxidante, favorecendo uma redução dos fatores de risco e uma melhoria das comorbidades³³.

Em crescente destaque encontra-se a cirurgia da obesidade, tendo em vista o número crescente de obesos e a efetividade das técnicas cirúrgicas em melhorar as comorbidades associadas e em aumentar a qualidade de vida^{33,34}. Alguns estudos têm sido realizados com intuito de comprovar as melhorias promovidas pela cirurgia bariátrica na obesidade e em suas comorbidades decorrentes do estresse oxidativo. Estudo com pacientes do serviço de cirurgia bariátrica no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU-UFS) submetidos à cirurgia de «bypass» gástrico analisou o perfil lipídico dos indivíduos antes e após a cirurgia bariátrica. Como resultado, houve uma melhoria após o procedimento, sendo a maior redução constatada nos níveis médios de triglicerídeos (32,0%), além de um aumento do colesterol associado à lipoproteína de alta densidade (HDL)³³. Outro estudo, realizado na mesma instituição, avaliou o impacto da cirurgia bariátrica sobre o risco de evento cardiovascular em obesos através do escore de Framingham, que foi calculado antes e após 6 meses de cirurgia. Os resultados foram significativamente diferentes, sendo que o risco de Framingham, o colesterol total, o HDL e a pressão arterial obtiveram valores melhores quando comparados ao pré-operatório, comprovando que a cirurgia bariátrica reduz o risco de ocorrência de evento cardiovascular em pacientes obesos⁴⁰. Além destes benefícios, a análise da fibrose

hepática antes e após a cirurgia bariátrica através do NAFLD Fibrosis Score comprovou que há redução no grau de fibrose hepática dos pacientes submetidos à gastroplastia³⁵.

Estudo desenvolvido pelo Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná acompanhou 50 pacientes com obesidade mórbida e portadores de doença hepática não-alcoólica durante o período de 1 ano após terem sido submetidos à gastroplastia com «bypass» em Y de Roux. O trabalho comprovou a melhora significativa da doença hepática não alcoólica, cuja fisiopatologia envolve o aumento do estresse oxidativo presente no obeso¹⁰.

Métodos para aferição da peroxidação lipídica

Os estudos acerca da avaliação do estresse oxidativo vêm adquirindo relevância significativa, pois os marcadores oxidativos desempenham fundamental papel na gênese de enfermidades crônicas degenerativas. Assim, são importantes ferramentas que possibilitam o planejamento de ações eficazes no controle e prevenção de tais doenças³⁵.

Atualmente, no entanto, não há consenso sobre qual o método mais útil, mais confiável, mais acurado ou específico para os diferentes tipos de dano oxidativo³⁶. Enquanto os trabalhos de sistematização prosseguem, é útil conhecer os principais marcadores e os métodos mais utilizados para sua quantificação.

A deteção direta das ERO em sistemas biológicos é dificultada pelas suas concentrações extremamente baixas (da ordem de $10^{-11}M$) e pelas suas altas velocidades de reação, chegando ao ponto de as taxas de produção serem iguais às taxas de reação com biomoléculas³⁵. Os subprodutos das ERO podem ser aferidos diretamente por técnica de ressonância paramagnética de eletrões, porém o custo e outras limitações desta avaliação dificultam seu uso regular³⁸.

Os métodos mais utilizados para aferição indireta das ERO e, consequentemente, das lesões oxidativas são os espectrofotométricos e cromatométricos, que medem a atividade enzimática (superóxido dismutase - SOD, catalase, glutationa peroxidase - GSH-Px e glutationa redutase - GSH-Rd) e/ou a concentração de tripeptídeos (glutationa reduzida - GSH) e aldeídos (malondialdeído - MDA). Estas medidas podem ser realizadas em tecidos, sangue e outros fluidos. A lipoperoxidação de membranas é habitualmente monitorada pelo método do MDA (malondialdeído) e o estresse oxidativo, por dosagens de GSSG (forma oxidata da glutatona) e/ou pelo cálculo da razão GSSG/GSH²⁶.

Esses métodos baseiam-se no uso de biomarcadores que, segundo Zwart et al.²⁹ e LaBaer³⁹, possuem características passíveis de avaliação e mensuração, como indicadoras de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. Como tal, refletiriam mudanças em sistemas biológicos relacionadas à exposição ou aos efeitos de xenobióticos, ou outros tipos de fatores, como os relacionados a doenças.

Os marcadores de peroxidação lipídica são classificados em primários (os hidroperóxidos lipídicos) e secundários, que derivam da β -ruptura dos hidroperóxidos lipídicos. As principais metodologias utilizadas para a avaliação da lipoperoxidação oxidativa em sistemas biológicos medem a formação de produtos gerados durante as diferentes fases deste processo. Portanto, é importante utilizar as várias

Tabela 3 Biomarcadores de dano oxidativo em algumas doenças humanas

Doenças	Biomarcadores de Dano
Câncer; doença cardiovascular; aterosclerose	MDA, razão GSH/GSSG, NO ₂ – Tyr, F ₂ – isoprostano
Doença de Alzheimer	MDA, HNE, razão GSH/GSSG, acroleína,
Doença de Parkinson	MDA, HNE, razão GSH/GSSG, acroleína, isoprostano, proteínas carboniladas, nível de ferro
Diabetes mellitus	MDA, razão GSH/GSSG, proteínas S-glutationadas, F ₂ – isoprostano, NO ₂ – Tyr

Fonte: Vasconcelos et al.²⁷

técnicas disponíveis, pois a sua escolha dependerá do propósito do investigador, ou seja, da fase do processo de LPO que se pretenda avaliar. A tabela 3 exemplifica alguns biomarcadores para doenças selecionadas³⁹.

Malondialdeido

O malondialdeido (MDA) é um biomarcador, produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da β -ruptura de endociclização de ácidos gordos polinsaturados, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosahexaenoíco^{20,40}. Ele é considerado, atualmente, um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de lesão oxidativa em plasma^{26,27}.

O método introduzido por Yagi (1976) tem sido amplamente utilizado. O princípio deste método consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando como produto um cromógeno de cor rosa fluorescente capaz de ser detectado através de leitura espectrofotométrica e cuja absorção ocorre em λ de 532 nm e fluorescência em 553 nm^{37,39}.

Apesar de sua simplicidade e facilidade de execução, o teste do TBA não é específico para o malondialdeido, reagindo com uma ampla variedade de compostos como açúcares, aminoácidos, proteína, aminas e bilirrubina. Por este motivo é também denominado teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (Thiobarbituric Acid-Reactive Substances – TBARS)^{35,41}.

O teste de TBARS, apesar de sabidamente inespecífico, ainda apresenta ampla aplicação devido, especialmente, à sua facilidade de execução e baixo custo em comparação aos demais métodos. A possibilidade de reação do TBA com substâncias intervenientes tem como consequência superestimar a extensão do processo de peroxidação lipídica, decorrente da detecção não só do malondialdeido, mas também de compostos interferentes. Assim, uma adaptação relevante de tal técnica consiste em associá-la com a separação do composto malondialdeido-TBA (MDA-TBA), por meio de técnicas cromatográficas^{22,41,42}.

Alguns estudos referem o uso do método de avaliação do estresse oxidativo pelo TBARS em obesos. No Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, realizou-se estudo em indivíduos obesos em pré-operatório de cirurgia bariátrica para quantificação da lipoperoxidação plasmática utilizando o MDA como marcador (técnica de análise da formação de substâncias reativas a TBARS). Neste estudo, foram analisados 22 indivíduos de ambos os gêneros, distribuídos em grupo obesidade e controle. Como resultado,

o nível médio de MDA foi estatisticamente superior no grupo obesidade ($p=0,04$), permitindo inferir aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e maior estresse oxidativo em obesos⁶.

Sobre o efeito da dieta restritiva e da perda de peso na geração das ERO, outro estudo concluiu que a concentração plasmática de TBARS diminuiu $87,9 \pm 5,8\%$ no grupo obeso na quarta semana de dieta⁴³. Em pesquisa experimental com ratos Cani et al. observaram que os animais tratados com dieta hipercalórica apresentaram concentração de TBARS significativamente mais elevada que o grupo controle⁴⁴.

Detecção do 4-hidroxinonenal

O 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), um aldeído insaturado, é o produto quantitativamente mais importante da degradação peroxidativa de ácidos graxos ômega 6⁴¹.

Mais recentemente, a quantificação de HNE no plasma passou a ser realizada com pentafluorobenzil-hidroxilamina para formar o derivado pentafluorobenziloxima, que é analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com ionização química negativa (GC/NICI-MS) usando HNE deuterado como padrão interno. Nesse método, apesar de haver um aumento significativo na recuperação de HNE do plasma (60-80 versus 8%), sua concentração permanece, ainda, mais baixa do que a de outros aldeídos marcadores de peroxidação lipídica, devido, provavelmente, à ligação aos grupos sulfidrila ou amina de proteínas^{42,45}, sendo motivo de crítica. Um problema adicional é que o HNE pode ser gerado durante as fases de armazenamento, extração e análise, produzindo resultados erroneamente elevados^{5,12}.

Detecção dos isoprostano (8-epi-prostaglandina 2 α ,8-epi-PGF2 α)

Outro método de avaliação do estresse oxidativo baseado na oxidação lipídica, consiste na aferição dos isoprostano, compostos derivados da ação de radicais livres sobre os ácidos graxos polinsaturados^{35,46-49}. Os isoprostano pertencem à família dos eicosanoídes, de origem não enzimática e são produzidos pela oxidação do ácido araquidônico. Inicialmente, são formados nos fosfolipídios da membrana celular e depois liberados para os fluidos biológicos pela fosfolipase³⁷. Ao contrário do que ocorre com os hidroperóxidos lipídicos (produtos primários da peroxidação lipídica), que se decompõem rapidamente nos fluidos e tecidos humanos, F2-isoprostano são produtos secundários

da peroxidação lipídica quimicamente estáveis podendo, inclusive, ser dosados na urina. Essa estabilidade é a razão pela qual a sua quantificação desperta interesse, com o aparecimento de muitos protocolos para sua análise. Além disso, são produtos específicos da peroxidação lipídica, estando presentes em quantidades detectáveis em todos os fluidos biológicos e tecidos, sua formação aumenta drasticamente em modelos animais de dano oxidativo⁴⁴. Como MDA, ele é, também, considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de dano oxidativo no plasma.

Entre as técnicas empregadas para detecção de isoprostanos destacam-se os radioimunoensaios (radioimmunoassays – RIA), os imunoensaios enzimáticos (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay – ELISA) e as técnicas cromatográficas (separação) associadas à espectrometria de massa (detecção) (GC-MS). A aplicação de técnicas imunológicas, na aferição de 8-iso-PGF₂α tem limitada especificidade, decorrente das possíveis reações cruzadas com outros prostanoides. A GC-MS tem boa especificidade, no entanto, consiste em uma técnica onerosa e, consequentemente, de difícil execução em estudos populacionais^{20,33,47}. Assim, os métodos radiométricos e imunológicos são mais utilizados^{37,50}.

A aferição de isoprostanos pode ser realizada em fluidos biológicos, soro e plasma sanguíneo e urina, sendo que a utilização de urina tem maior aplicabilidade.

Hidrocarbonetos: etano e pentano

A quantificação de compostos voláteis constitui em outra técnica de aferição da oxidação lipídica. Entre tais compostos destacam-se, além dos isoprostanos e aldeídos, os hidrocarbonetos: etano e pentano. Estes 2 últimos são formados mediante peroxidação lipídica dos ácidos graxos polinsaturados da série ômega 3 e 6, respectivamente. Os hidrocarbonetos são os mais voláteis e dessa forma são os mais frequentemente utilizados^{35,51-53}.

A aferição baseia-se na concentração de hidrocarbonetos exalados no ar expirado. Existe uma grande variedade de técnicas para tal propósito, estas variam em relação à forma de coleta, armazenamento e processamento das amostras. Como decorrência desta falta de padronização, ocorre relevante variação entre os resultados provenientes de diferentes estudos. A análise das amostras, usualmente, se dá por meio de GC. Apesar da grande variedade de técnicas, as limitações são comuns e convergem para o fato da contaminação das amostras com a presença de etano e pentano no ambiente⁵².

Sugere-se que a aferição do etano tenha maior viabilidade em predizer a peroxidação lipídica, entre as causas destaca-se o fato do etano ser metabolizado em menor extensão que o pentano, ser menos solúvel em tecidos, exibir menor coeficiente de variação diária na sua taxa de exalação e, ainda, sofrer menor influência de fatores intervenientes na sua taxa de exalação⁵³.

Teste do alaranjado de xilenol (xilenol-orange)

Os hidroperóxidos são produtos primários da peroxidação dos AGPI⁵⁵, daí a importância da sua medida, uma vez

que a maioria dos métodos avalia seus produtos de degradação. Um dos métodos utilizados para se determinar a concentração de hidroperóxidos em amostras biológicas é aquele que utiliza o xilenol-orange. Este método baseia-se no princípio de que os hidroperóxidos oxidam ferro II a ferro III, o qual reage com o xilenol orange, produzindo um cromóforo que tem absorção máxima em 560 nm⁵⁵. Os resultados são relativamente reproduutíveis e o método pode ser usado para a determinação de hidroperóxidos em fase aquosa e lipídica⁵⁶. É um método simples, que não exige equipamentos sofisticados, porém é inespecífico, pois pode sofrer interferências de diversas substâncias presentes no plasma sanguíneo.

Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por quimiluminescência

O método de CLAE com detecção por quimiluminescência tem sido bastante utilizado na mensuração específica de hidroperóxidos lipídicos^{54,56,57,45,58,59}. Utilizando este método é possível a quantificação de hidroperóxidos presentes em amostras biológicas, sem interferências de outras biomoléculas.

Esse método tem demonstrado alta sensibilidade, podendo-se detectar níveis abaixo de 10 nmol/L, dependendo da qualidade do detector.

Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

O uso da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) para a análise de amostras biológicas é recente, tendo havido importante avanço na última década.

Uma das vantagens mais importantes desta técnica é permitir a separação, quantificação e elucidação estrutural das substâncias presentes na amostra, de maneira contínua, sem a necessidade de purificação ou derivatização prévias, permitindo análise muito mais rápida e eficiente. Outro ponto importante é a possibilidade de se analisar substâncias não voláteis ou termolábeis, o que seria difícil em outras técnicas como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas⁶⁰.

A técnica de CLAE-EM tem sido utilizada em diversos trabalhos na análise de derivados lipídicos e seus produtos de oxidação⁶⁰⁻⁶⁵ e representa o que há de mais avançado em técnicas de detecção e caracterização qualitativa e quantitativa de biomoléculas em matrizes biológicas. Além disso, os resultados obtidos por esta técnica apresentam elevadas especificidade e sensibilidade.

Dosagem de ácidos hidroxieicosatetranóicos

Os ácidos hidroxieicosatetranóicos são derivados da oxidação do ácido aracídônico e os ácidos hidroxiocat-decanóicos (HODE), resultantes da oxidação do ácido linoléico⁶⁶.

Estes compostos já foram encontrados aderidos à placa aterosclerótica e cogita-se que sua presença está associada a placas instáveis e sujeitas à ruptura⁶⁷.

A presença destes compostos pode ser determinada, após a extração da fração lipídica do material a ser analisado, por técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Conclusão

A obesidade tem prevalência mundial crescente e a análise de fatores que participam na fisiopatologia das comorbidades tem elevada importância. Nesse sentido, o estudo do estresse oxidativo nos obesos tem papel fundamental. Tal atitude pode balizar medidas futuras para prevenir o surgimento dessas doenças, bem como colaborar no tratamento.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

Agradecemos ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) da Universidade Tiradentes (UNIT) e ao Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Sergipe pelo apoio para desenvolvimento dessa linha de pesquisa acerca da aferição e comprovação dos elevados níveis de estresse oxidativo na obesidade.

Bibliografia

1. Sartorelli dS, Franco LJ. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. *Cad Saude Publica*. 2003;19 Supl. I:49-50.
2. Aballay LR, Eynard AR, Diaz MP, Navarro A, Muñoz SE. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. *Nutr Rev*. 2013;71:168-79.
3. Carneiro G, Faria AN, Filho FFR, Guimarães A, Erário D, Ferreira SRG, et al. Influência da distribuição da gordura corporal sobre a prevalência de hipertensão arterial e outros fatores de risco cardiovascular em indivíduos obesos. *Rev Assoc Med Bras*. 2003;49:306.
4. Zhang Y, Chen X. Reducing selenoprotein P expression suppresses adipocyte differentiation as a result of increased preadipocyte inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300:77-85.
5. Cabrera MA, Jacob FW. Obesidade em idosos: prevalência, distribuição e associação com hábitos e co-morbididades. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2001;45.
6. Lima SCVC, Arrais RF, Almeida MG, Souza ZML, Pedrosa LFC. Perfil lipídico e peroxidação de lipídeos no plasma em crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade. *J Pediatr*. 2004;80.
7. Melissas J, Malliaraki N, Papadakis JA, Taflampas P, Kampa M, Castanhas E. Plasma antioxidant capacity in morbidly obese patients before and after weight loss. *Obes Surg*. 2006;16:314-20.
8. Mahapatra S, Padhiary K, Mishra TK, Nayak N, Satpathy M. Study on body mass index, lipid profile and lipid peroxidation status in coronary artery disease. *J Indian Med Assoc*. 1998;96:39-41.
9. Ferraz EM, Arruda PC, Barcelar TS, Ferraz AAB, Albuquerque AC, Leão CS. Tratamento cirúrgico da obesidade mórbida. *Rev Col Bras Cir*. 2003;30:98-105.
10. Freitas AC, Freitas DT, Parolin MB, Campos ACL, Coelho JCU. Doença hepática não-alcoólica: evolução após derivação gástrico-junal em Y de Roux pela técnica de fobi-capella. *Arq Gastroenterol*. 2007;44:49-53.
11. Mahantanatawee K, Manthey JA, Talcott ST, Goodner K, Baldwin EA. Total antioxidant activity and fiber content of select Florigragrown tropical fruits. *J Agric Food Chem*. 2006;54:7355-63.
12. Stahl W, Aust O, Sies H, Polidori MC. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: Tocopherols and carotenoids. *J Chromatogr*. 2001;936:83-93.
13. Ferreira AP, Oliveira CER, França NM. Síndrome metabólica em crianças obesas e fatores de risco para doenças cardiovasculares de acordo com a resistência à insulina (HOMA-IR). *J Pediatr*. 2007;83.
14. Carneiro G, Faria AN, Ribeiro Filho FF, Guimarães A, Lerário D, Ferreira SR, et al. Influência da distribuição da gordura corporal sobre a prevalência de hipertensão arterial e outros fatores de risco cardiovascular em indivíduos obesos. *Rev Ass Med Bras*. 2003;49.
15. Zhang Y, Cen X. Reducing selenoprotein P expression suppresses adipocyte differentiation as a result of increased preadipocyte inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300:77-85.
16. Alves MRM, Alves JR, Pereira LTA, Wartha ERA, Guimarães AO, Boaventura RF, et al. Avaliação do estresse oxidativo em indivíduos obesos no pré-operatório de cirurgia bariátrica. *Arq Bras Cir Dig*. 2011;24. Suppl 1:9.
17. Barbosa KB, Costa NM, Alfenas RC, Sérgio Oliveira De Paula SO, Minim VP, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr*. 2010;23.
18. Visioli F, Keaney JR, Halliwell B. *Cardiovascular Research*, 47. Boston: Evans Department of Medicine and Whitaker Cardiovascular Institute; 2000. p. 409.
19. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. 2000;63:1035-42.
20. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology and Medicine*. 3^a ed. Oxford: Oxford University Press; 2002, 4^a ed., 2007.
21. Buschwald H. Consensus statement: Bariatric surgery for morbid obesity: Health implications for patients, health professionals and third-party payers. *Surg Obes Relat Dis*. 2005;1: 371-81.
22. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004;142:231-55.
23. Andrade-Wartha ERS. Capacidade antioxidante *in vitro* do pedúnculo de caju (*Anacardium Occidentale L.*) e efeito sobre as enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.
24. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994;74:139-61.
25. Sampaio RC, Moraes C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. *Motriz: Revista de Educação Física* (online). 2010;16:506-15.
26. Luz HKM, Schell LW, Faustino LR, Manoel C, Silva G, Figueiredo JR, et al. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2011;39:956.
27. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Benfato MS, Manfredini V, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quím Nova*. 2007;1323-38.
28. Olusij SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte enzymes in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26:1159-64.
29. Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep*. 1997;17:3-8.
30. Lechleitner M, Koch T, Harold M, Dzien A, Hoppiahler F. Tumour necrosis factor-alpha plasma level in patients with type 1 diabetes mellitus and its association with glycaemic control and cardiovascular risk factors. *J Intern Med*. 2000;248:67-76.

31. Neves CF. Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo e estado inflamatório em pacientes no pré e pós-operatório de cirurgia da obesidade [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2010.
32. Buschwald H. Consensus conference statement bariatric surgery for morbid obesity: Health implications for patients, health professionals and third-party payers. *Surg Obes Relat Dis.* 2005;1:371-81.
33. Manson JE, Stampfer MJ, Hennekens CH, Willet WC. Body weight and longevity. A reassessment. *JAMA.* 1987;257:353-8.
34. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3ed. Oxford: Clarendon Press; 1999. p. 156-9.
35. Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr.* 2003;133 Suppl 3:933-40.
36. Comenetti C. Efeitos da suplementação com castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa H.B.K) sobre o estresse oxidativo em mulheres obesas e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutatona peroxidase 1 [tese]. Universidade de São Paulo; 2010.
37. Labaer J. Introduction to the special biomarkers issue. *Proteome Res.* 4. Harvard Institute of Proteomics; 2005. p. 1053-9.
38. Franco LDP. Dieta hiperlipídica e exercício físico: consequências sobre o metabolismo e a peroxidação lipídica - estudo em modelo animal. [Dissertação Mestrado]. Universidade Estadual Paulista; 2007.
39. Lechleitner M, Koch T, Harold M, Dzien A, Hoppiahler F. Tumour necrosis factor-alpha plasma level in patients with type 1 diabetes mellitus and its association with glycaemic control and cardiovascular risk factors. *J Intern Med.* 2000;67-76.
40. Lima E, Parra D. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* 2001;37:293-303.
41. Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charao MF, Moro AM, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;4:619-24.
42. Reyes GC, Sánchez IR, Calzadamendonza CC, Olivares-Corichi IM. Disfunción endotelial y estrés oxidativo. *Rev Endocrinol Nutr.* 2006;14:233-6.
43. Dandona P, Mohanty P, Ghani H, Aljada A, Browne R, Hamouda W, et al. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:355-62.
44. Cani PD, Biblioni R, Knauf C. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 2008;57:1470-81.
45. Moore K, Roberts II J. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radical Res.* 1998;28:659-71.
46. Therond PT, Roussetot DB, Spraul AD, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: An analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2000;3:373-84.
47. McCall MR, Balz F. Free Radical Biol. Med. 1999;26:1034.
48. Benzie IFF. Lipid peroxidation: A review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr.* 1996;47:233-61.
49. Lawson JA, Rokach J, Fitzgerald GA. Isoprostanes: Formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem.* 1999;274:24441-4.
50. Keaney JFJ, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, et al. J Obesity and systemic oxidative stress: Clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:434-9.
51. Bohnstedt KC, Karlberg B, Wahlund LO, Jonhagen ME, Basun H, Schmidt S. Determination of isoprostanes in urine samples from Alzheimer patients using porous graphitic carbon liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;796:11-9.
52. Antunes MV, Lazzaretti C, Gamaro GD, Linden R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Rev Bras de Ciênc Farmac.* 2008;44:2.
53. Miller ER, Appel LJ, Risby TH. Effect of dietary patterns on measures of lipid peroxidation: Results from a randomized clinical trial. *Circulation.* 1998;98:2390-5.
54. Knutson MD, Lim AK, Viteri FE. A practical and reliable method for measuring ethane and pentane in expired air from humans. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:560-71.
55. Knutson MD, Handelman GJ, Viteri FE. Methods for measuring ethane and pentane in expired air from rats and humans. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:514-9.
56. Yamamoto Y, Brodsky MH, Baker JC, Ames BN. Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1987;160:7-13.
57. Jiang Z, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylene orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids.* 1991;26:853-6.
58. Miyazawa T. Determination of phospholipid hydroperoxides in human blood plasma by a chemiluminescence-HPLC assay. *Free Radical Biol Med.* 1989;7:209-17.
59. Sattler W, Mohr D, Stocker R. Rapid isolation of lipoproteins and assessment of their peroxidation by high-performance liquid chromatography postcolumn chemiluminescence. *Methods Enzymol.* 1994;233:469-89.
60. Yasuda M, Narita S. Simutaneous determination of phospholipid hydroperoxides and cholestryler ester hydroperoxides in human plasma by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;693:211-27.
61. Mashima R, Onodera K, Yamamoto Y. Regiosomeric distribution of cholestryler linoleate hydroperoxides and hydroxides in plasma from healthy humans provides evidence for free radical-mediated lipid peroxidation in vivo. *J Lip Res.* 2000;41:109-15.
62. Kim HY, Salem JR N. Liquid chromatography-mas spectrometry of lipids. *Prog Lip Res.* 1993;32:221-45.
63. Gallon AA, Pryor WA. The identification of the allylic nitrite and nitro derivatives of methyl linoleate and methyl linoleate by negative chemical ionization mass spectroscopy. *Lipids.* 1993;28:125-33.
64. Rezanka T. Analysis of very long chain polyunsaturated fatty acid using high-performance liquid chromatography- atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Biochem Syst Ecolog.* 2000;28:847-56.
65. Balazy M, Iesaki T, Park JL, Jiang H, Kaminski PM, Wolin M. Vicinal nitrohydroeicosatrienoic acids: Vasodilatador lipids formed by reaction of nitrogen dioxide with arachidonic acid. *J Pharm Exper Therap.* 2001;2:1-9.
66. Waddington EI, Croft KD, Sienuarine K, Latham B, Pudsey IB. Fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque: An analysis of clinical and histopathological correlates. *Atherosclerosis.* 2003;167:111-20.
67. Mallat Z, Nakamura T, Ohan J, Leseche G, Tedgui A, Maclof J, et al. The relationship of hydroxyeicosatetraenoic acids and F2-Isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1999;103:421-7.