

**ANA PAULA DA SILVA MONTEIRO CABRAL**

**EFEITO DA INGESTÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS EM  
LIPOPROTEÍNAS E ANTIOXIDANTES HUMANOS**

**PORTO**

**1998**

Trabalho de dissertação apresentado na Faculdade de Farmácia da  
Universidade do Porto para a obtenção do grau de Mestre em Controlo da  
Qualidade na área científica de Água e Alimentos  
(Resolução nº8/SC/SG/93, D.R. Nº126, II Série 31/05/93).

1998

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Controlo  
da Qualidade (Área de Água e Alimentos)

EFEITO DA INGESTÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS EM LIPOPROTEÍNAS E  
ANTIOXIDANTES HUMANOS

ORIENTADOR:  
Professora Doutora Elisabeth Bayer Castro  
Serviço de Bioquímica  
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Comunicações com origem neste trabalho:

Lipid profile, antioxidants, lipid peroxidation, tobacco and diet according to sex. EBM Castro, AP Cabral, A Santos-Silva, I Rebelo, A Guerra, A Quintanilha. Pánel aceite para apresentação no International Congress on Vascular Disease Prevention, Glasgow, 4-8 Maio 1998.

Moderate alcohol consumption: Lipid profile, oxidant and antioxidants. EBM Castro, AP Cabral, A Santos-Silva, I Rebelo, A Guerra, A Quintanilha. Pánel aceite para apresentação no International Congress on Vascular Disease Prevention, Glasgow, 4-8 Maio 1998.

## ABSTRACT

In recent years moderate alcohol consumption has been studied regarding its protective effect on cardiovascular diseases. These findings are particularly interesting in countries with a Mediterranean-type diet (high consumption of bread, vegetables, fruit, cheese, vegetable fat and wine) such as Portugal.

The present study tried to clarify the beneficial effect of moderate alcohol consumption in a small sampling of the Portuguese population. We evaluated a lipid profile (total cholesterol, HDLc, LDLc, Lp(a), triglycerides, apoA-I and apoB), also some antioxidants (SOD, GPX, uric acid and total antioxidant status) and some products of lipid peroxidation (MDA and MDA+4-hydroxialkenals) in two groups with no history of cardiovascular disease. Each group was composed by 31 individuals, one group with only non-drinkers and the other with moderate drinkers (four or more alcoholic drinks per week).

Concerning the lipid profile, no statistically significant differences were found between the two groups except for HDLc and apoA-I, with higher mean values for the drinkers group. The study of the antioxidants showed that the non-drinkers had statistically significant lower values of uric acid and total antioxidant status and that SOD and GPX were also lower for that group, although with no significant differences. The products of lipid peroxidation were higher in the drinkers group.

These data suggest that moderate alcohol consumption confers protection by increasing the HDLc concentration and by triggering the antioxidant mechanisms and eventually preventing the oxidative modifications ascribed to atherogenesis.

## RESUMO

Vários estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais têm colocado em evidência o efeito protector do consumo moderado de bebidas alcoólicas contra as doenças cardiovasculares (DCV). O vinho, componente importante das dietas do tipo Mediterrânico, parece oferecer protecção adicional em relação aos outros tipos de bebidas.

Esta trabalho pretendeu fornecer alguns dados sobre a relação entre consumo de bebidas alcoólicas e DCV na população portuguesa, dado não existirem até à presente data estudos sobre esse assunto e a alimentação dos Portugueses ser do tipo Mediterrânico. Numa pequena amostragem da população constituída por 80 participantes dos quais 18 foram excluídos por apresentarem valores elevados da enzima hepática  $\gamma$ GT, foram utilizados 62 indivíduos (39 mulheres e 23 homens) com idades compreendidas entre os 21 e os 64 anos, para estudar o efeito do consumo de bebidas alcoólicas nos lípidos séricos (colesterol total, HDL, LDL, Lp(a), triglicédeos, apolipoproteínas A-I e B), em alguns antioxidantes (ácido úrico, GPX, SOD, *status* antioxidante total) e nos níveis de peroxidação lipídica (MDA, MDA+4-HNE).

Em relação aos marcadores lípidicos estudados, apenas se encontraram diferenças estatísticas significativas para a apoA-I e HDL, com o grupo dos consumidores a apresentar os valores médios mais elevados. Este grupo apresenta, igualmente, valores superiores de *status* antioxidante total e ácido úrico, com significado estatístico. Os níveis das enzimas SOD e GPX, embora mais elevados para os consumidores, não têm significado estatístico, necessitando os resultados de confirmação numa amostragem maior. Os níveis de peroxidação lipídica avaliados pelo conjunto do MDA+4HNE são mais altos no grupo dos consumidores, talvez por reflexo dos hábitos alimentares destes indivíduos.

Estes dados sugerem ser o efeito protector da ingestão das bebidas alcoólicas mediado pelo aumento da concentração sérica de HDL e pelo aumento de algumas das defesas antioxidantes presentes no organismo humano.

*ÍNDICE*

**AGRADECIMENTOS**

**ABREVIATURAS**

**INTRODUÇÃO**

	01
<b>I. DOENÇAS CARDIOVASCULARES E ATROSCLEROSE</b>	02
I.1. Factores de risco	02
I.2. As lesões ateroscleróticas e a aterogénese	04
I.3. Patogénese da aterosclerose	05
I.3.1. Teoria monoclonal	06
I.3.2. Teoria da resposta a injúria	06
I.3.3. O papel dos macrófagos	07
I.4. Lipoproteínas, aterogénese e desenvolvimento de DCV	08
I.4.1. Quilomicras	09
I.4.1.1. Aspectos bioquímicos	09
I.4.2. Lipoproteínas de muito baixa densidade-VLDL	09
I.4.2.1. Aspectos bioquímicos	09
I.4.3. VLDL, quilomicras e aterosclerose	10
I.4.4. Lipoproteínas de baixa densidade-LDL	11
I.4.4.1. Aspectos bioquímicos	11
I.4.4.2. LDL e aterosclerose	11
I.4.5. Lipoproteínas de alta densidade-HDL	14
I.4.5.1. Aspectos bioquímicos	14
I.4.5.2. HDL e aterosclerose	14
I.5.6. Lipoproteína (a) - Lp(a)	17
I.5.6.1. Aspectos bioquímicos	17
I.5.6.2. Lp(a) e aterosclerose	17
I.5.7. Apolipoproteínas A	19
I.5.8. Apolipoproteínas B	19
I.5.9. Apolipoproteínas C	19
I.5.10. Apolipoproteínas E	20
<b>II. BEBIDAS ALCOÓLICAS E DOENÇAS CARDIOVASCULARES</b>	21
II.1. Relação entre consumo de bebidas alcoólicas e redução de risco de DCV – - Estudos epidemiológicos e ecológicos	21



<b>III. ATEROSCLEROSE E ANTIOXIDANTES</b>	27
III.1. Peroxidação lipídica	27
III.1.1. Modificação oxidativa da LDL	28
III.2. Antioxidantes biológicos e mecanismos de acção	32
III.2.1. Antioxidantes preventivos	33
III.2.2. Antioxidantes bloqueadores de cadeia	34
III.3. Antioxidantes biológicos e aterosclerose	35
<b>IV. EFEITOS ESPECÍFICOS DO VINHO</b>	36
IV.1. Evidências epidemiológicas	36
IV.2. Possíveis mecanismos para o papel protector do vinho	40
IV.2.1. Acção do álcool nos mecanismos hemostáticos	40
IV.2.2. Componentes fenólicos do vinho e sua acção	41
IV.2.2.1. Os componentes fenólicos do vinho	42
IV.2.2.2. Os componentes fenólicos e a aterogénese	45
IV.2.2.3. Os componentes fenólicos e a trombose	46
<b>V. A POPULAÇÃO PORTUGUESA</b>	47
<b>VI. OBJECTIVOS DO TRABALHO</b>	47
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	48
I.1. Amostragem	49
I.2. Colheitas de sangue	49
I.3. Determinação do colesterol total	49
I.4. Determinação do colesterol HDL	50
I.5. Determinação do colesterol LDL	50
I.6. Determinação dos triglicérides	51
I.7. Determinação da apolipoproteína A-I	51
I.8. Determinação da apolipoproteína B	51
I.9. Determinação da lipoproteína (a)	52
I.10. Determinação da hemoglobina	52
I.11. Determinação do <i>status</i> antioxidante total	52
I.12. Determinação da actividade da superóxido dismutase	53
I.13. Determinação da actividade da glutathiona peroxidase	53
I.14. Determinação do ácido úrico	54

I.13. Determinação da actividade da glutathiona peroxidase	53
I.14. Determinação do ácido úrico	54
I.15. Determinação da peroxidação lipídica	54
I.16. Determinação da $\gamma$ glutamiltransferase	55
I.17. Controlo da qualidade	55
I.18. Análise estatística	55
ANEXO	56
INQUÉRITO	57

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 59

### **I. RESULTADOS** 60

I.1. Amostragem	60
I.2. Marcadores lipídicos	61
I.3. Antioxidantes	63
I.4. Peroxidação lipídica	64
I.5. Efeito da mudança de consumo	65
I.6. A influência da idade e do sexo nos diferentes marcadores	65

### **II. DISCUSSÃO** 67

II.1. Amostragem	67
II.2. Marcadores lipídicos	67
II.3. Antioxidantes	70
II.4. Peroxidação lipídica	77

### **III. CONCLUSÕES** 79

## **BIBLIOGRAFIA** 81

*AGRADECIMENTOS*

À Professora Doutora Elisabeth Bayer Castro pela sua orientação, disponibilidade e amizade que sempre me dedicou,

À Professora Doutora Alice Santos Silva e à Professora Doutora Irene Rebelo do Serviço de Bioquímica pelo apoio, interesse e amizade com que me acompanharam durante todo o trabalho,

Aos restantes elementos do Serviço de Bioquímica pelo apoio e simpatia sempre demonstrados,

À Dra. Laura Pereira e à Dra. Susana Coimbra do Laboratório de Análises Clínicas pela preciosa ajuda na colheita das amostras e na execução de algumas análises,

À Dra. Graça Salcedo, directora do laboratório Endoclab, pela amizade e apoio sempre demonstrados e por me ter permitido a coordenação da minha vida profissional com a realização do Mestrado,

A todos os que gentilmente se prontificaram a participar neste trabalho,

A todos os que de algum modo me ajudaram e incentivaram ao longo do trabalho,

O meu muito obrigado

*ABREVIATURAS*

Apo	Apolipoproteína
CETP	Cholesterol Ester Transfer Protein (Proteína de transferência de ésteres de colesterol)
DCV	Doença cardiovascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fig.	Figura
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione (forma reduzida)
GSSG	Glutathione (forma oxidada)
HDL	High Density Lipoprotein (Lipoproteína de alta densidade)
4-HNE	4-Hidroxinonenal
IDL	Intermediate Density Lipoprotein (Lipoproteína de densidade Intermédia)
LCAT	Lecitina Colesterol Acil Transferase
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de baixa densidade)
Lp(a)	Lipoproteína (a)
LPL	Lipoproteína Lipase
LRP	LDL Receptor related Protein ou Chylomicron Remnant Receptor (Receptor das quilomicras remanescentes)
MDA	Malondialdeído
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
OMS	Organização Mundial de Saúde
oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1 (Inibidor do activador do plasminogénio-1)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor (Factor de crescimento derivado das plaquetas)
PUFA	PolyUnsaturated Fatty Acid (Ácido gordo poliinsaturado)
SOD	Superóxido dismutase
t-PA	Tissue-type Plasminogen Activator (Activador do plasminogénio dos tecidos)
VLDL	Very Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de muito baixa densidade)
vs	<i>versus</i>

## *INTRODUÇÃO*

## I. DOENÇAS CARDIOVASCULARES E ATEROSCLEROSE

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morbidade e mortalidade nos países industrializados, com papel importante nas causas de morte prematura, como se pode constatar na figura 1. A aterosclerose apresenta-se como a principal causadora de morte por doença cardiovascular. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a aterosclerose como uma combinação variável de modificações na camada íntima arterial, envolvendo a acumulação de lípidos, carboidratos, sangue e seus constituintes, acompanhada pela formação de tecido fibroso, calcificação e alterações da camada média desses vasos sanguíneos. A aterosclerose pode ser encarada como uma forma especial de arteriosclerose, na qual se verificam deposições patogénicas, significativas, de lípidos nas paredes arteriais.

### I.1. FACTORES DE RISCO

Factores ambientais e genéticos têm vindo a ser identificados como potenciadores do desenvolvimento de aterosclerose. O carácter multifactorial desta doença é enfatizado pelo facto de a presença de mais de um dos factores de risco ser particularmente prejudicial, devido a um efeito sinérgico.

Se há alguns anos só se considerava a relação entre colesterol sérico e as doenças cardiovasculares, o aprofundar dos conhecimentos sobre o metabolismo das lipoproteínas, demonstrou a relação entre o aumento da concentração das lipoproteínas e apolipoproteína potencialmente aterogénicas - LDL ("low density lipoprotein"-lipoproteína de baixa densidade), LDL modificada, Lp(a) (lipoproteína (a)) e apoB (apolipoproteína B) - e a diminuição da concentração da lipoproteína e apolipoproteína consideradas protectoras- HDL ("high density lipoprotein"-lipoproteína de alta densidade), apoA-I - e o aparecimento de DCV.

Para além das dislipidémias aterogénicas, outros parâmetros clínicos e biológicos estão estatisticamente associados com o aparecimento de acidentes cardiovasculares. Entre eles encontram-se os factores de risco não modificáveis como sejam a idade, sexo masculino (figura 2), história familiar de doença cardiovascular precoce e história pessoal de doença cardiovascular isquémica. Os factores de risco modificáveis incluem o tabagismo, pressão sanguínea elevada, diabetes mellitus e obesidade com resistência insulínica<sup>2,3</sup>.



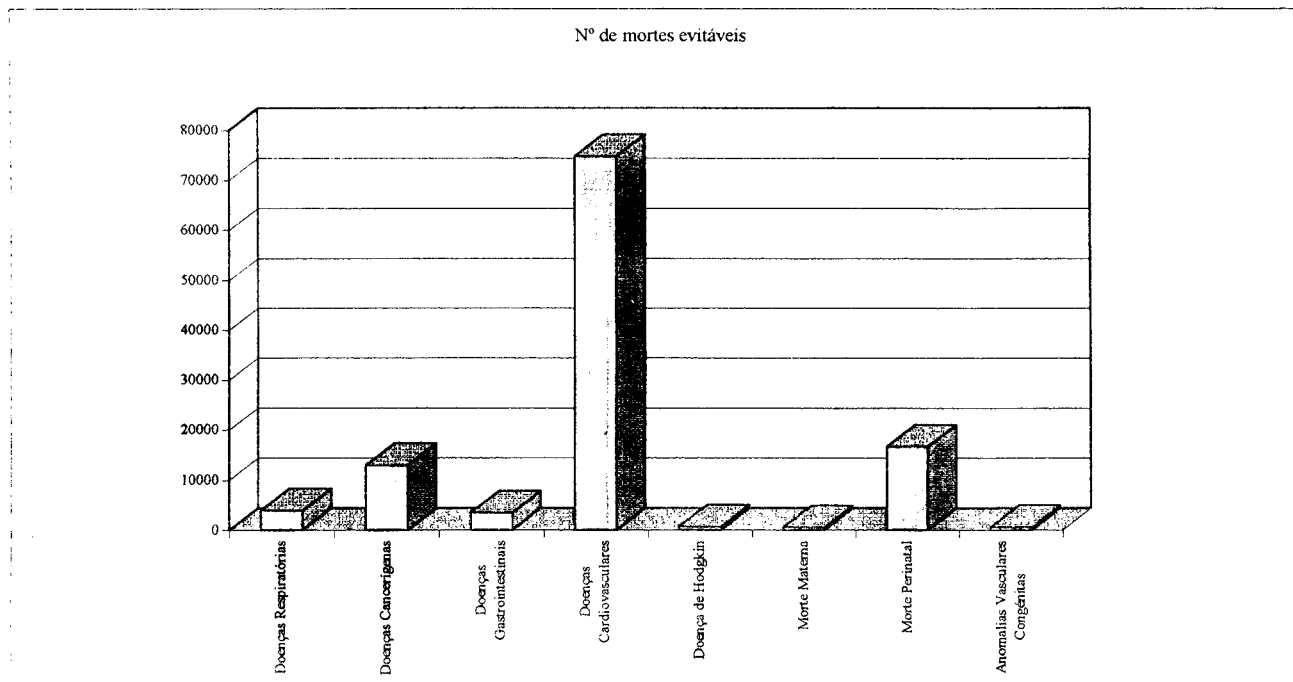


Figura 1 - Número de mortes evitáveis na Europa, no período de 1980 a 1984, caso tivessem sido tomadas as medidas profiláticas adequadas<sup>1</sup>.

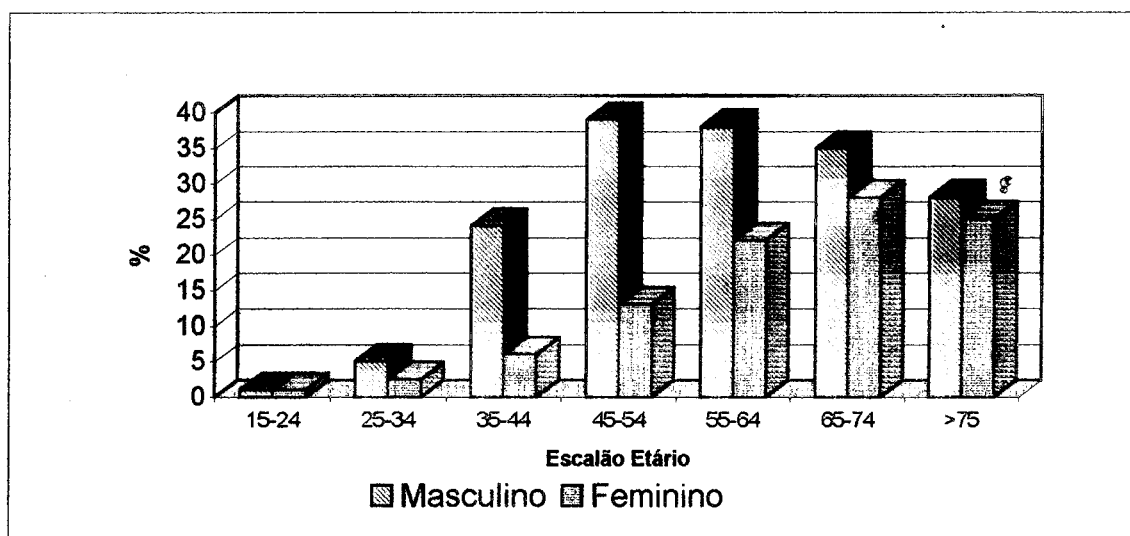


Figura 2 - Morte por DCV em diferentes escalões etários expressa como percentagem de todas as mortes<sup>2</sup>.

## 1.2. AS LESÕES ATEROSCLERÓTICAS E A ATEROGÊNESE

As lesões ateroscleróticas podem surgir em diferentes idades, com localização anatômica e velocidade de propagação diferentes, mas o seu processo de desenvolvimento é semelhante em todos os indivíduos.

As estrias gordas (figura 3A) são a primeira forma da lesão aterosclerótica, podendo ser observadas nas primeiras décadas de vida do indivíduo e são constituídas por depósitos intra e extracelulares de ésteres de colesterol e outros lípidos, macrófagos e algumas células de músculo liso. São visíveis como estrias ou manchas na íntima da aorta, artérias coronárias e outras artérias musculares largas. A infiltração de lípidos do sangue parece afectar a formação destas lesões. O papel das lipoproteínas aterogénicas como, por exemplo, as LDL oxidadas, capazes de causarem a conversão de macrófagos/monócitos em células "foam" ou espumosas foi recentemente reconhecido como estando na origem das estrias gordas. Estas lesões podem regredir mas também podem progredir para outra forma designada por placa aterosclerótica ou ateroma (figura 3B), caracterizada por um número aumentado de células do músculo liso da íntima rodeadas por tecido conjuntivo e quantidades variáveis de lípidos intra e extracelulares. No lúmen da artéria, a lesão apresenta-se geralmente coberta por uma capa fibrosa de células de músculo liso e tecido conjuntivo, com um arranjo lacunar. Por baixo da lesão, poderá haver uma área de detritos necróticos, cristais de colesterol e calcificação<sup>5,6</sup>.

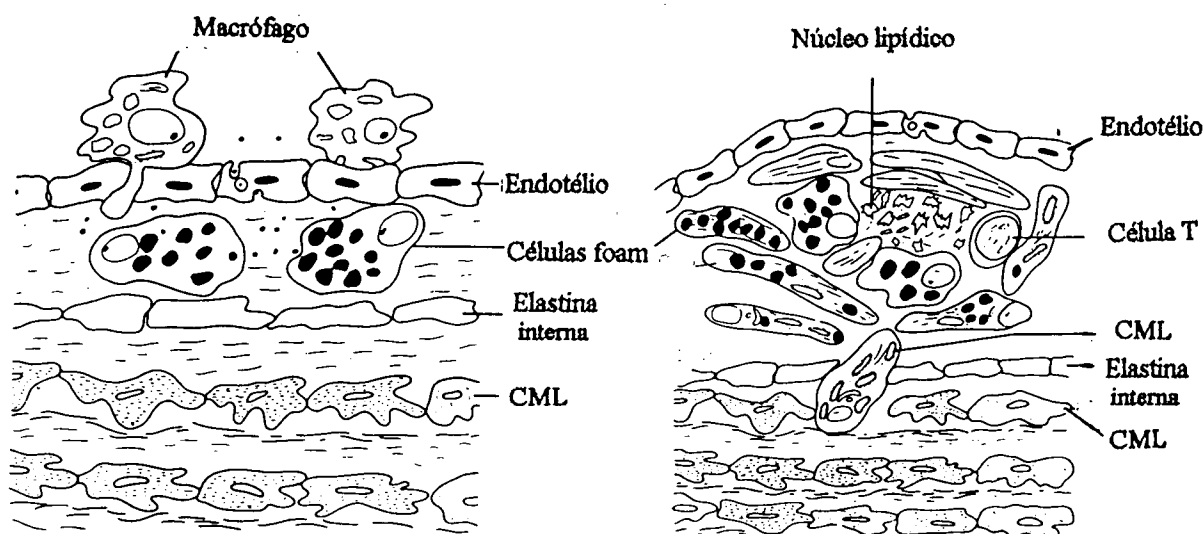


Figura 3A - Esquema simplificado de uma estria gorda. (CML-célula do músculo liso)<sup>4</sup>.

Figura 3B - Esquema simplificado de uma placa fibrosa<sup>4</sup>.

A progressão da aterosclerose durante um certo período de tempo poderá dever-se ao aparecimento de novas lesões ou por um aumento da gravidade das lesões pré-existentes, embora este último aspecto pareça ser mais importante no desenvolvimento da doença<sup>7</sup>.

O desenvolvimento dos ateromas pode ser lento e progressivo ou apresentar-se com complicações súbitas. O crescimento progressivo é muito lento, desenrolando-se ao longo de décadas e dá-se através da acumulação de lípidos, proteínas do tecido conjuntivo e proliferação de vários tipos de células (músculo liso, tecido conjuntivo).

As fases agudas de desenvolvimento são maioritariamente causadas por fissura ou ruptura de uma placa, geralmente jovem, rica em lípidos e macrófagos e pobre em tecido fibroso, resultando na formação de um trombo. A probabilidade de fissura relaciona-se com a quantidade de lípidos extracelulares no núcleo da placa<sup>7</sup>.

Muitos estudos apontam ainda para a formação preferencial das estrias em bifurcações e locais nos quais as propriedades reológicas do sangue podem contribuir para danificar o endotélio e levar à formação de lesões<sup>6,7</sup>.

A tabela 1 sumariza as fases da aterosclerose.

Tabela 1 - As fases da aterosclerose

1. Lesão jovem: Estrias gordas, elevações gelatinosas e microtrombos
2. Lesão avançada: Fibrose e placas ateroscleróticas (ateromas)
3. Complicações das lesões: Ulceração, calcificação e hemorragia (levando a apoplexia, gangrena, aneurisma e enfarte)

### 1.3. PATOGÉNESE DA ATEROSCLEROSE

A patogénese da aterosclerose é um fenómeno multifactorial e desenvolve-se por fases. Existem várias teorias embora pareça provável que nem todas os ateromas se desenvolvam seguindo a mesma sequência de eventos e que muitos passos estejam envolvidos nesse desenvolvimento. As teorias podem dividir-se entre as que colocam

o ênfase numa forma de dano ou disfunção endotelial (hipótese de resposta a injúria) e as que o colocam numa disfunção das células do músculo liso (teoria monoclonal)<sup>8</sup>

### I.3.1. TEORIA MONOCLONAL

A teoria monoclonal foi proposta após a observação que algumas das placas pequenas da aorta parecem derivar de uma única célula. Foi então sugerido que o agente seria um mutagénio e que a célula-alvo seria a célula do músculo liso<sup>9</sup>.

Outros estudos sugeriram não ser universal a monoclonalidade das placas e que é pouco provável que seja importante no crescimento de uma placa para esta causar dano clínico. No entanto, o carácter monoclonal de alguns ateromas merece consideração. É possível que hajam agentes ambientais que promovam este tipo de crescimento dos ateromas, como sejam, carcinogénios e vírus<sup>9</sup>.

### I.3.2. TEORIA DA RESPOSTA A INJÚRIA

A teoria da resposta a injúria proposta por Ross<sup>6</sup>, junta observações relacionadas com a integridade endotelial, função celular dos macrófagos e células do músculo liso, lípidos e formação de trombos. Nesta hipótese, pelo menos duas vias podem levar à formação de lesões da íntima com proliferação das células do músculo liso.

Uma via, demonstrada na hipercolesterolemia, implica lesão do endotélio, facto esse que vai induzir a secreção de factores de crescimento, antecedida pela adesão de monócitos. Ambos os tipos celulares vão continuar a produzir factores de crescimento e os monócitos poderão penetrar no espaço subendotelial e transformarem-se em células "foam", levando à formação das placas fibrosas. Os macrófagos poderão igualmente danificar o endotélio e ocorrer a agregação plaquetária nos locais danificados, passando a existir mais um produtor de factores de crescimento, ou seja, as plaquetas.

Na segunda via, não se verificam alterações morfológicas do endotélio mas há uma estimulação das suas células que irão produzir e libertar factores de crescimento que vão induzir a migração e proliferação das células do músculo liso e possivelmente a libertação de factores de crescimento pelas células de músculo liso estimuladas. Esta via ou suas variantes poderão ser importantes em casos de diabetes,

hipertensão, tabagismo ou outras circunstâncias associadas com um aumento da incidência de aterosclerose.

### I.3.3. O PAPEL DOS MACRÓFAGOS

O monócito é a fonte do macrófago, em quase todos os tecidos e respostas inflamatórias nas quais é possível encontrar estas células. Uma das primeiras interações celulares que ocorrem durante a hipercolesterolemia é a ligação e migração subendotelial dos monócitos. Para além disso, os macrófagos produzem uma das substâncias quimioatrativas mais potentes conhecidas, o leucotrieno B<sub>4</sub>, um produto do ácido araquidónico, via o sistema lipoxigenase. Este e outros produtos do sistema lipoxigenase poderão ser muito importantes na modulação da parede arterial durante a aterogénese.

Os macrófagos têm receptores tanto para partículas de LDL nativas como modificadas. Este facto e a sua capacidade de desesterificar e reesterificar o colesterol são importantes para a acumulação de lípidos no seu interior e a formação das células "foam". A sua localização subendotelial, a acumulação lípidica e a fagocitose de materiais extracelulares representam a sua função "scavenger" normal.

Os macrófagos são capazes de causar dano a células vizinhas pela formação de substâncias tóxicas (anião superóxido, hidrolases lisossomais) e pela oxidação de lípidos. Deste modo, podem danificar o endotélio sobrejacente e pôr em marcha os acontecimentos que culminarão na proliferação das lesões ateroscleróticas. Neste sentido, o desenvolvimento de uma estria gorda pode ser considerado como a resposta inflamatória a modificações locais na artéria. Estas modificações poderão estar associadas com alguns factores de risco de aterosclerose, como níveis plasmáticos elevados de colesterol LDL nos casos de hipercolesterolemia.

Os macrófagos estimulam a proliferação de tecido conjuntivo, segregando um mitogénio similar ao PDGF ("platelet derived growth factor" – factor de crescimento derivado das plaquetas). e também segregam um factor de crescimento dos fibroblastos que é um potente mitogénio para as células do tecido conjuntivo e células endoteliais.

Resumindo, os macrófagos são células que com o estímulo apropriado, são capazes de sintetizar e libertar três factores de crescimento específicos para diferentes células alvo: PDGF para as células do tecido conjuntivo como as células do músculo

liso e fibroblastos; factor de crescimento dos fibroblastos para as células endoteliais vasculares; e factor de crescimento epidérmico para as células epiteliais<sup>6</sup>.

#### I.4. LIPOPROTEÍNAS, ATEROGÉNESE E DESENVOLVIMENTO DE DCV

As lipoproteínas são as unidades funcionais de transporte no sangue dos lípidos insolúveis em água. Além disso, as lipoproteínas contêm "sinais" que regulam o movimento de alguns lípidos, em particular, para dentro e para fora de células e tecidos-alvo. Apresentam-se como complexos de alto peso molecular, classificadas de acordo com a sua densidade, solúveis em meio aquoso e compostas por vários tipos de lípidos (colesterol, triglicerídeos, fosfolípidos) e uma ou mais proteínas específicas designadas por apolipoproteínas. Cada lipoproteína é constituída por um núcleo de lípidos hidrofóbicos rodeados por uma camada hidrofílica de lípidos polares e apolipoproteínas. A figura 4 esquematiza a organização típica de uma lipoproteína.

As principais lipoproteínas são as quilomicras, VLDL ("very low density lipoprotein"-lipoproteína de muito baixa densidade), LDL e HDL que serão discutidas com mais pormenor nos capítulos seguintes.

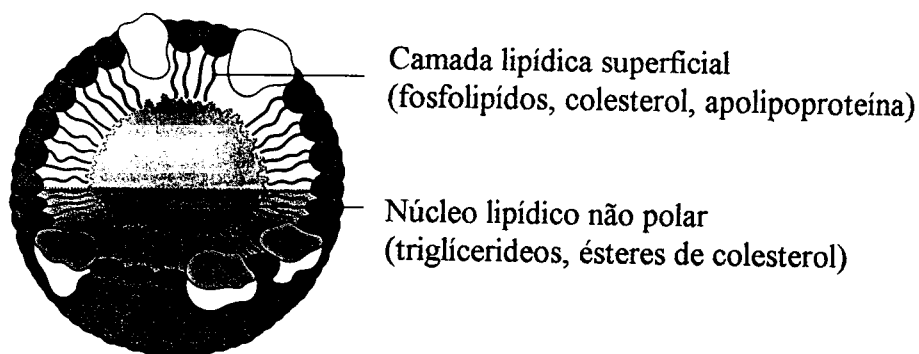


Figura 4 - Esquema de uma lipoproteína. O corte permite ver o núcleo não polar composto por ésteres de colesterol e triglicerídeos, rodeado por fosfolípidos e apolipoproteína(s)<sup>10</sup>.

## I.4.1. QUILOMICRAS

### I.4.1.1. ASPECTOS BIOQUÍMICOS

As quilomicras têm uma densidade inferior a 0,95g/ml e formam-se nas células da mucosa intestinal a partir das gorduras da dieta. São compostas principalmente por triglicéridos, mas também têm fosfolípidos, colesterol e seus ésteres e como apolipoproteínas contêm apoA-I, A-II, A-IV e B-48. A sua principal função é o transporte dos triglicéridos absorvidos da dieta. Do intestino passam para o sistema linfático e entram na circulação geral pelo ducto torácico.

Os triglicéridos das quilomicras servem de substrato à enzima lipoproteína lipase (LPL) que os hidroliza libertando os ácidos gordos para utilização celular. A LPL é activada pela apolipoproteína C-II. As apoC e E das quilomicras, assim como ésteres de colesterol são transferidos para as HDL, processo este que começa já no sistema linfático. À medida que as quilomicras perdem os seus triglicéridos, tornam-se mais pequenas e as partículas resultantes designam-se por **quilomicras remanescentes**, enriquecidas em ésteres de colesterol e apoE. Estas novas partículas são internalizadas pelo fígado muito rapidamente, devido à presença da apoE na sua superfície que se liga à LRP ("LDL receptor-related protein" ou "chylomicron remnant receptor" - receptor das quilomicras remanescentes). Apenas em casos de desordem metabólica ou após uma refeição rica em gorduras é possível encontrar quilomicras em circulação<sup>3,10,11</sup>.

## I.4.2. LIPOPROTEÍNAS DE MUITO BAIXA DENSIDADE - VLDL

### I.4.2.1. ASPECTOS BIOQUÍMICOS

As partículas VLDL têm uma densidade inferior a 1,006g/ml, formam-se no fígado e são as principais responsáveis pelo transporte dos triglicéridos sintetizados por este órgão para os tecidos periféricos. Quando estas partículas passam para os capilares, entram em contacto com a LPL, cuja acção já foi referida. Dá-se, igualmente, transferência de colesterol e seus ésteres e de apoC e E para as lipoproteínas HDL.

As VLDL têm na sua composição as apolipoproteínas B-100, C e E. Após a retirada de quase todos os triglicéridos pela acção da LPL, obtêm-se partículas designadas por **VLDL remanescentes** ou **IDL's** ("intermediate-density lipoprotein - lipoproteína de densidade intermédia), que permanecem em circulação. Algumas

dessas partículas são internalizadas e removidas directamente pelo fígado, cujas células têm receptores que reconhecem e ligam a apoE. Estas partículas perfazem cerca de 2/3 do total das VLDL remanescentes. O restante 1/3 é convertido em LDL, um processo catalizado pelas enzimas LPL e lipase hepática que se encontram no parênquima hepático<sup>3,10,12</sup>.

#### **I.4.3. VLDL, QUILOMICRAS E ATEROSCLEROSE**

A fracção de VLDL remanescentes convertida em LDL influencia muito a concentração sérica desta última. Se mais partículas de VLDL forem produzidas, mais partículas de LDL se formarão. Os factores determinantes de um aumento de produção de VLDL hepática são actualmente alvo de estudo<sup>12,13</sup>.

A ligação de VLDL ou de quilomicras a superfícies arteriais contendo LPL leva à lipólise dos triglicerídeos e decréscimo de tamanho das partículas aderentes. Modificações adicionais causadas por trocas lípidicas de natureza heterogénea, mediadas por proteínas de transferência, com partículas de HDL e LDL resultam num enriquecimento em ésteres de colesterol e aumento da aterogenicidade. A libertação simultânea dos ácidos gordos poderá causar dano endotelial e iniciar acontecimentos trombóticos. As trocas lípidicas estão aumentadas em estados hiperlipidémicos.

Resumindo, a participação das lipoproteínas ricas em triglicerídeos na aterogénese é possível:

Directamente - o reconhecimento destas partículas pelos receptores dos macrófagos resulta numa acumulação de colesterol nestas células;

Indirectamente - em situações de hipertrigliceridemia há aumento das trocas triglicerídeos/ésteres de colesterol entre as VLDL e as HDL. As VLDL ricas em ésteres de colesterol poderão transportá-los para os macrófagos, enquanto que as HDL enriquecidas em triglicerídeos sofrem posterior metabolização e são rapidamente depuradas. O efeito final é uma acumulação de ésteres de colesterol nos macrófagos e baixa dos níveis de HDL. Níveis aumentados de triglicerídeos também estão associados com a produção de subespécies de LDL, mais pequenas, mais densas que estão associadas com um risco aumentado de DCV<sup>3</sup>.

Alguns dados apontam também para uma relação entre valores aumentados de triglicerídeos e alterações no sistema de coagulação, com níveis superiores de alguns



factores de coagulação (VIIc, VIIIc e Xc) e alterações nos factores fibrinolíticos (PAI-1 aumentado e actividade do tPA diminuída)<sup>3</sup>.

#### I.4.4. LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE - LDL

##### I.4.4.1. ASPECTOS BIOQUÍMICOS

As LDL resultam da metabolização das VLDL e têm valores de densidade compreendidos entre 1,019 e 1,063 g/ml. Apresentam um núcleo constituído por moléculas de colesterol esterificado, sendo a cadeia gorda mais comum o linoleato. Este núcleo hidrofóbico é rodeado por fosfolípidos, colesterol não esterificado e uma única molécula de **apolipoproteína B-100**. Esta proteína glicosilada de 550kDa contém 4563 aminoácidos e é sintetizada no fígado. As apoB-100 são reconhecidas pelos receptores de LDL presentes na membrana plasmática de quase todas as células, permitindo assim a entrada das LDL nessas mesmas células, por um processo designado por **endocitose mediada por receptor de alta afinidade**. Para além desta via de degradação, as LDL são catabolizadas por outras duas vias: uma na qual os macrófagos absorvem LDL modificada química ou fisicamente por um mecanismo "scavenger", não sujeito a controlo "feedback" e outra, de baixa afinidade, presente em todas as células. As LDL apresentam várias subpopulações que variam em densidade, tamanho, massa molecular e composição<sup>12,13,14</sup>.

A função das LDL é transportar colesterol para os tecidos periféricos e aí regular a sua síntese *de novo*.

Quando o metabolismo lipídico ocorre normalmente, as LDL são depuradas pelo hepatócito, onde o colesterol é eliminado juntamente com os sais biliares ou vai constituir parte do "pool" de reserva de colesterol hepático<sup>12,13</sup>.

##### I.4.4.2. LDL E ATEROSCLEROSE

Até há pouco tempo só se considerava uma elevada concentração sérica de colesterol como um importante factor de risco de DCV. Actualmente vários estudos apontam para uma mediação deste risco através da LDL, a mais importante lipoproteína transportadora de colesterol do soro que tendo sido identificada como a principal lipoproteína aterogénica é também o principal alvo de uma terapia de redução dos níveis de colesterol. A análise química de placas ateroscleróticas, após necropsia, aponta para uma composição em ácidos gordos semelhante à plasmática.

Além disso, moléculas de apoB-100 e mesmo partículas de LDL foram identificadas nessas placas. Restantes evidências provêm de estudos de casos de hipercolesterolemia, como a hipercolesterolemia familiar (HF), na qual há deficiência de receptores de LDL, com aumento da concentração sérica de LDL e nos quais é vulgar verificarem-se casos prematuros de DCV. Em estudos *in vitro* de aterogênese e utilizando culturas de macrófagos e células do músculo liso, é possível observar-se a transformação em células "foam" induzida pela LDL<sup>12</sup>.

Existem várias teorias no que concerne os mecanismos através dos quais a LDL produz aterosclerose (figura 5):

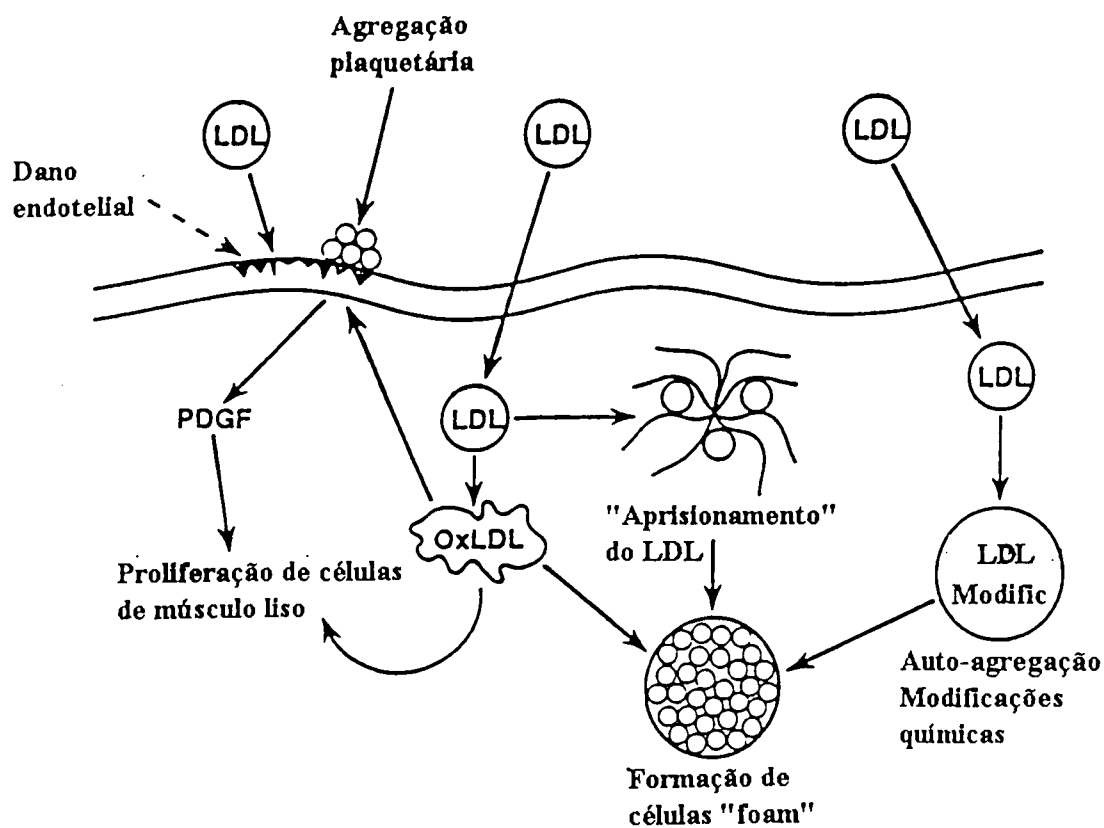


Figura 5 - Mecanismos propostos de aterogênese<sup>12</sup> (oxLDL=LDL oxidada).

A teoria de dano endotelial proposta por Ross<sup>6</sup> sugere ser esse acontecimento o primeiro passo da aterogénese, resultando na agregação plaquetária na superfície endotelial lesada, aonde as plaquetas vão libertar factores de crescimento que causam a proliferação das células de músculo liso. Modelos *in vitro* sugerem que altas concentrações de LDL podem ser tóxicas para a superfície endotelial com o dano resultante a levar à iniciação da aterosclerose. Segundo esta teoria, a LDL poderá promover aterosclerose sem nunca entrar na parede arterial. No entanto, as placas ateroscleróticas contêm grandes quantidades de colesterol, aparentemente derivadas da LDL circulante, motivo pelo qual a entrada da LDL parece ser um requisito para a deposição do colesterol. As partículas de LDL são suficientemente pequenas para penetrarem na parede arterial, passando entre ou através das células endoteliais, dependendo a taxa de penetração da concentração plasmática da LDL. Após entrar poderá desencadear uma série de acontecimentos que aceleram a aterosclerose<sup>12</sup>.

A deposição de colesterol na matriz intracelular da parede arterial poderá advir da interacção entre a LDL e moléculas de proteoglicano e elastina, moléculas para as quais a apoB-100 parece ter uma grande afinidade.

A deposição das partículas de LDL na matriz extracelular poderá levar à degradação lenta dessas partículas, com modificações suficientes para permitir a sua captura pela via "scavenger" dos macrófagos. Outras modificações poderão ocorrer como sejam oxidações<sup>15</sup>, que de qualquer modo tornam as partículas de LDL susceptíveis de entrarem pela via "scavenger". De notar, que o colesterol acumulado nas células de músculo liso que também se tornaram células "foam", parecer provir igualmente da LDL.

Algumas evidências apontam no sentido de que as partículas de LDL depois de oxidadas, serem um factor quimiotático importante, atraindo macrófagos para as lesões em crescimento, parecendo apenas ser necessária uma oxidação mínima para permitir esta acção por parte da LDL.

Em conclusão, a LDL parece ser necessária à formação das estrias gordas. Há evidência de que outros factores de DCV como o tabagismo, hipertensão e diabetes actuam principalmente na promoção da conversão das estrias em placas. Sendo assim, a LDL pode ser considerada o principal factor de risco, o que é consistente com evidências epidemiológicas - em populações com níveis baixos de colesterol LDL, o desenvolvimento de aterosclerose avançada parece ser relativamente rara, mesmo na presença de outros factores de risco<sup>12</sup>.

## I.4.5. LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDADE - HDL

### I.4.5.1. ASPECTOS BIOQUÍMICOS

As HDL influenciam a retardação ou regressão do processo aterosclerótico.

As HDL são capazes de captar o colesterol libertado para o plasma por células mortas e membranas em "turnover". Outra função é o fornecimento de apoC para as quilomicras e VLDL.

As partículas de HDL apresentam um núcleo de ésteres de colesterol e pequenas quantidades de triglicerídeos. Na sua superfície encontram-se moléculas de colesterol livre, fosfolípidos e várias apolipoproteínas, das quais as A-I e A-II são as principais. As partículas de HDL podem ser separadas por ultracentrifugação com valores de densidades compreendidos entre 1,063 e 1,21g/ml. Dentro deste intervalo estabeleceram-se subdivisões designadas por HDL<sub>3</sub> (d=1,125-1,210g/ml) e por HDL<sub>2</sub> (d=1,063-1,125g/ml); estas últimas subdividem-se, por sua vez, em HDL<sub>2b</sub> (d=1,063-1,100g/ml) e em HDL<sub>2a</sub> (d=1,100-1,125g/ml). A sua diferenciação traduz-se igualmente por aspectos estruturais e funcionais. De referir que estudos recentes apontam para a existência de pelo menos dez espécies discretas de HDL, que são "mascaradas" pela ultracentrifugação<sup>10,15</sup>.

As HDL são sintetizadas no fígado e intestino, na forma de um precursor, a HDL nascente, com forma discooidal, que contém fosfolípidos, colesterol, apoE e apoA. Na circulação sanguínea adquire apoC e mais apoA de outras lipoproteínas e colesterol livre tanto de lipoproteínas como de células. Uma aciltransferase presente na HDL nascente, LCAT (lecitina:colesterol aciltransferase) esterifica essas moléculas de colesterol com um ácido gordo proveniente da fosfatidilcolina. Esta enzima é activada pela apoA-I. Esse colesterol esterificado é rapidamente transferido para as VLDL ou LDL, pela acção de uma proteína de transferência de ésteres de colesterol<sup>10,16</sup>.

A figura 6 esquematiza os metabolismos das lipoproteínas até aqui referidas.

### I.4.5.2. HDL E ATEROSCLEROSE

O efeito anti-aterogénico da HDL é explicado pelo transporte reverso de colesterol. Neste mecanismo o colesterol livre é transferido das células periféricas para uma subpopulação de HDL aceitadora. A transferência do colesterol é

influenciada pela difusão do colesterol da membrana plasmática para os espaços intersticiais. Um mecanismo adicional produtor de efluxo de colesterol é sugerido pelo papel da HDL ligando-se a locais específicos da superfície celular, referidos como receptores de HDL. Esta ligação resulta no início de fenómenos intracelulares que levam à translocação de colesterol intracelular para a membrana plasmática. Este colesterol é transportado no sistema linfático periférico para o ducto torácico e finalmente para a circulação sistémica. O colesterol livre é então esterificado pela LCAT, os ésteres são transferidos pela acção da CETP ("cholesteryl ester transfer protein" - proteína da transferência de ésteres de colesterol) da HDL para a LDL e finalmente para a VLDL. Na forma de VLDL, os ésteres de colesterol são absorvidos pelo fígado através dos receptores de LDL<sup>14</sup>.

As partículas de HDL<sub>2</sub> e de HDL<sub>3</sub> sofrem continua remodelação e interconversão na circulação através da acção da LCAT, CETP e lipases. A participação e actividades relativas destas enzimas resultam na distribuição final das subpopulações de HDL. Ambas as concentrações estão diminuídas em DCV, sendo a redução de HDL<sub>2</sub> proporcionalmente maior do que a de HDL<sub>3</sub>.

Actualmente há dificuldade em concluir inequivocamente qual é a diminuição mais significativa. A HDL total é um bom, se não melhor prognosticador de DCV do que as fracções, pois tem a vantagem de ser menos controverso e mais fácil de determinar. Há a salientar que a grande variação dos resultados encontrados é devida às diferentes técnicas de separação e o facto de muitos estudos não considerarem devidamente o papel da colheita e a preservação adequada das amostras, factores que influenciam muito os resultados, dado a remodelação das partículas continuar *in vitro*, após a colheita<sup>14</sup>.

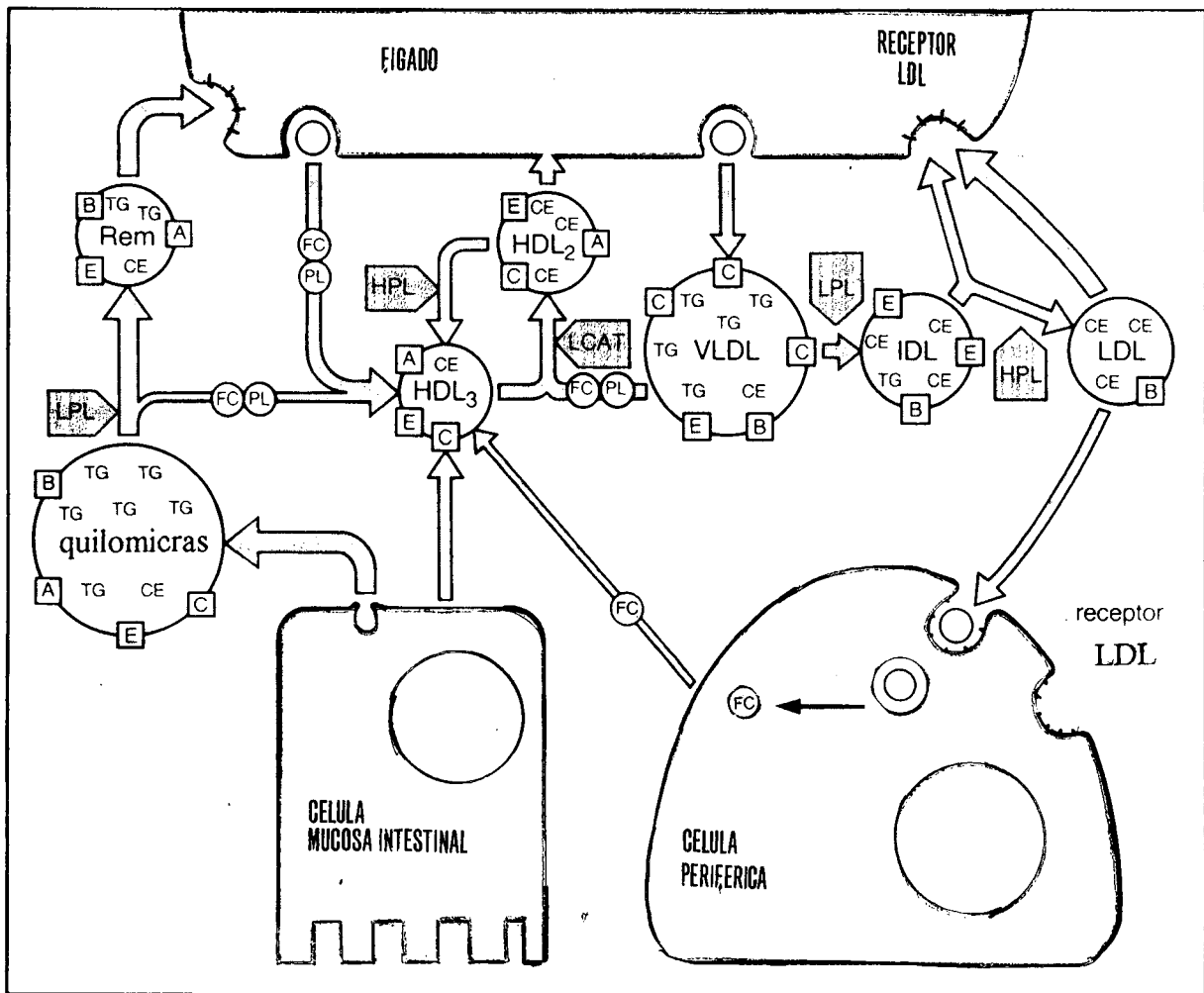


Figura 6 –Esquema representando os locais de origem e degradação das várias lipoproteínas assim como os seus metabolismos<sup>17</sup>.

A, B, C e E referem-se às apolipoproteínas e FC, PL, CE e TG ao colesterol livre, fosfolípidos, ésteres de colesterol e triglicerídeos, respectivamente.

As quilomicras transportam os lípidos alimentares para a circulação sistémica e transformam-se em quilomicras remanescentes pela acção da LPL. Estas novas partículas são internalizadas pelo fígado. As VLDL transportam os TG sintetizados pelo fígado para o plasma, onde sofrem degradação parcial, originando as IDL. As IDL são internalizadas via os receptores LDL (que as reconhece devido às apoB-100 e apoE) ou sofrem mais degradação para originar as LDL. A HDL são sintetizadas no fígado e intestino, recebendo igualmente materiais de outras lipoproteínas e de células.

## **I.4.6. LIPOPROTEÍNA (a) - Lp(a)**

### **I.4.6.1. ASPECTOS BIOQUÍMICOS**

A Lp(a) é uma variante genética da LDL, com semelhanças em termos de conteúdo e composição lipídicos. São muito ricas em ésteres de colesterol e apresentam uma parte proteica constituída por uma molécula de apoB-100 ligada por uma ponte bissulfito à apolipoproteína(a), que é uma glicoproteína.

A Lp(a) apresenta grande heterogeneidade de densidade devido à grande variação do conteúdo e composição dos lípidos do seu núcleo e polimorfismo de tamanho da sua glicoproteína específica. Em alguns indivíduos o polimorfismo de densidade pode também advir do facto da Lp(a) poder conter duas moléculas de apo(a) por cada molécula de apoB100, em oposição à estequiometria 1:1, mais comum. A sua heterogeneidade encontra-se tanto em indivíduos normolipidémicos como dislipidémicos<sup>18,19</sup>.

### **I.4.6.2. Lp(a) E ATEROSCLEROSE**

A concentração plasmática de Lp(a) e o fenótipo da apo(a) estão relacionados com o risco de DCV e de doença cerebrovascular.

Há evidência de acumulação de Lp(a) nas placas ateroscleróticas humanas. Após infiltração na parede arterial, estas partículas poderão ligar-se a componentes da matriz extracelular, como a fibronectina e glicosaminoglicanos. Ficam imobilizadas, contribuindo para a acumulação extracelular de colesterol e podem sofrer oxidação. O seu conteúdo de ácidos gordos, fosfolípidos, triglicerídeos e partículas antioxidantes vai determinar o seu comportamento oxidativo. A Lp(a) contém cerca de 25% menos vitamina E e 40% menos  $\beta$ -caroteno que a LDL. A Lp(a) modificada por produtos de degradação da peroxidação lipídica, como o malondialdeído, é absorvida activamente pelos macrófagos pela via "scavenger"<sup>18,19</sup>.

Outro aspecto das Lp(a) que contribui para a sua acção aterogénica, resulta dos seus efeitos na fibrinólise, devido à sua semelhança estrutural com o plasminogénio, o zimogénio inactivo da plasmina, que é a enzima principal da fibrinólise. A fibrinólise tem um papel muito importante na prevenção de acidentes trombóticos e a plasmina actua sobre a fibrina, tendo como resultado a clivagem desta em fragmentos solúveis. O plasminogénio dá origem à plasmina pela acção do t-PA, como se esquematiza na figura 7.

A Lp(a) pode interferir tanto com os componentes celulares como com os componentes proteicos envolvidos na fibrinólise. Poderá ligar-se à fibrina com posterior inclusão na lesão e aumento do conteúdo em colesterol desta última. Por outro lado, poderá competir com o plasminogénio para os locais de ligação à fibrina, inibindo a sua activação pelo t-pA na superfície da fibrina<sup>18,19</sup>.

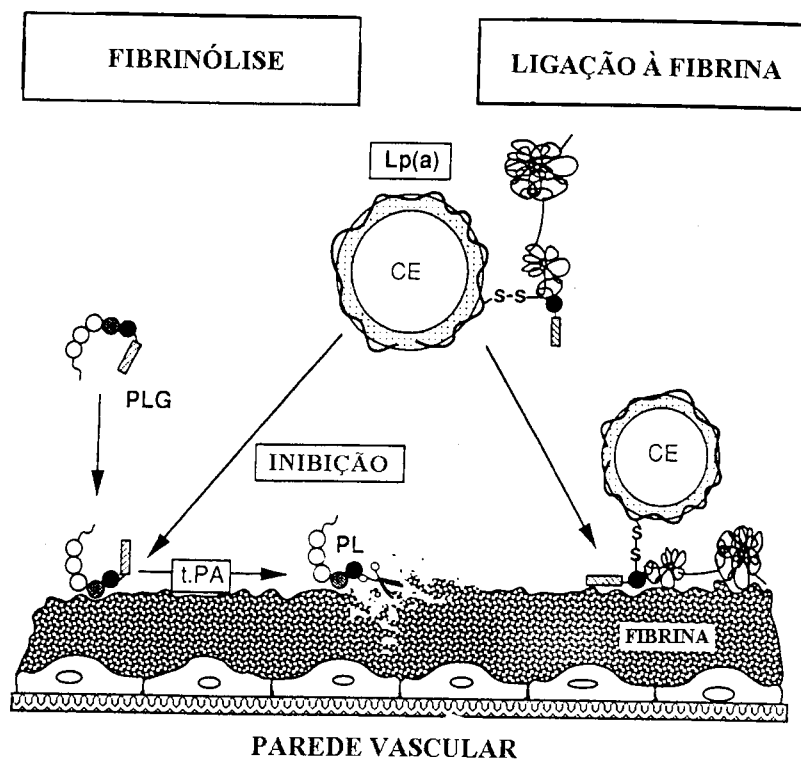


Figura 7 - As actividades pró-aterogénicas e pró-trombóticas da Lp(a). À direita, a interacção da Lp(a) contendo uma isoforma activa com afinidade para a fibrina poderá resultar na inclusão da Lp(a) na placa em desenvolvimento, aumentando o seu conteúdo em colesterol. À esquerda, a Lp(a) poderá competir com o plasminogénio (PLG) para a ligação à fibrina, inibindo deste modo a activação do PLG pelo t-PA na superfície da fibrina<sup>19</sup>.



### **I.5.7. APOLIPOPROTEÍNAS A**

A apoA-I, a principal apolipoproteína da HDL e a mais abundante do soro humano, medeia o efluxo de colesterol das membranas das células periféricas. Funciona também como activadora da enzima LCAT<sup>11,13</sup>.

A apoA-II é também uma proteína estrutural da HDL e foi indicada como activadora da lipase hepática.

A apoA-III também designada por apoD aparece na composição da HDL e juntamente com a apoA-I forma um constituinte do complexo de transferência de ésteres de colesterol, que é responsável pela transferência desses ésteres recém-sintetizados para outras lipoproteínas<sup>11,13</sup>.

A apo-IV é uma glicoproteína sintetizada no intestino, componente das quilomicras<sup>11,13</sup>.

### **I.4.8. APOLIPOPROTEÍNAS B**

As apolipoproteínas B são sintetizadas no intestino e no fígado e não migram de uma lipoproteína para outra. São elementos estruturais essenciais das quilomicras, VLDL, IDL, LDL e Lp(a), pois sendo um ligando para os receptores de LDL, facilitam a entrada de colesterol para os tecidos. Promovem também a acumulação de colesterol nos tecidos arteriais quer por modificações oxidativas quer por ligação aos proteoglicanos da matriz extracelular.

Nos humanos a molécula intestinal, designada por apoB-48, corresponde aos 2152 aminoácidos da extremidade amino da molécula hepática, a apoB-100. Aparentemente a apoB-48 não inclui o domínio de ligação aos receptores de LDL. A apoB-100 entra na composição das VLDL e LDL enquanto que a apoB-48 se encontra nas quilomicras<sup>11,20</sup>.

### **I.4.9. APOLIPOPROTEÍNAS C**

três grupos: apoC-I, C-II e C-III.

A apoC-I é activadora da enzima LCAT<sup>10,20</sup>.

A apoC-II é um cofactor da enzima LPL e durante a lipólise é transferida para as lipoproteínas ricas em triglicéridos para acelerar o seu catabolismo<sup>11,20</sup>.

A apoC-III, a mais abundante das apoC, é uma glicoproteína polimórfica, apresentando pelo menos três formas que dependem do seu conteúdo em ácido siálico. É um regulador, possivelmente um inibidor da LPL *in vitro*<sup>11,20</sup>.

#### I.4.10. APOLIPOPROTEÍNAS E

As apolipoproteínas E são sintetizadas em vários tipos de células. O gene codificador da apoE humana é polimórfico, apresentando três alelos ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$ ) que codificam três isoformas (E2, E3 e E4) que diferem entre si pela substituição de um único aminoácido e pela sua afinidade de ligação para os quatro receptores de apoE. A combinação das três isoformas dá origem a seis fenótipos com as seguintes frequências populacionais, semelhantes em ambos os sexos: 3/3 (60%), 3/4 (20%), 2/3 (14%), 4/4 (3%), 2/4 (2%) e 2/2 (0,5%). O polimorfismo da apoE é um importante determinante de risco de DCV e da doença de Alzheimer, com a prevalência do alelo  $\epsilon 4$  muito aumentada nesses doentes, em relação aos indivíduos normais.

A apoE serve como ligando para vários receptores celulares, sendo um importante elemento na remoção das lipoproteínas ricas em apoE (VLDL, quilomicras remanescentes e IDL) e portanto na homeostase do colesterol e triglicerídeos. Desempenha igualmente funções na activação de várias enzimas lipolíticas como a LPL, LCAT e lipoproteína hepática<sup>21,22</sup>.

## II. O CONSUMO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS E DCV

### II.1. RELAÇÃO ENTRE CONSUMO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS E REDUÇÃO DE RISCO DE DCV - ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS

Vários anos de estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais sobre aterosclerose e DCV, têm evidenciado uma relação inversa entre consumo moderado de bebidas alcoólicas e risco de morte por DCV. Estudos em populações, tanto mistas como unisexuais, demonstram ser essa relação independente de idade e sexo<sup>23,24,25,26,27</sup>.

Existe, no entanto, controvérsia sobre a existência de equivalência no que concerne o efeito protector, entre os vários tipos de bebidas alcoólicas. Alguns estudos epidemiológicos tendo como base um questionário sobre hábitos e preferências alimentares, concluíram não haver diferenças significativas. Outros provam uma relação inversa mais significativa para o consumo de vinho.

Vários trabalhos descrevem uma associação com uma curva em forma de J ou U entre consumo de álcool e risco de doenças cardiovasculares, com o menor risco encontrado entre os consumidores moderados e o maior risco entre os não consumidores e os fortes consumidores. A observação de que os não consumidores têm uma maior incidência de DCV do que os moderados levou à caracterização do consumo moderado como sendo "protector". Esta classificação é plausível atendendo a que se observa um aumento da concentração de HDL com o consumo de álcool<sup>25,28,29</sup>.

Shaper<sup>30</sup> apresentou o argumento de que a maior incidência de DCV nos não consumidores se devia ao facto de muitos abstémios o serem devido a fracas condições de saúde e que muitos eram na realidade ex-consumidores que tinham deixado de beber em consequência de doenças relacionadas com o álcool. A partir desta publicação muitos estudos têm contrariado esta teoria e têm excluído este tipo de pessoas dos seus estudos.

Jackson<sup>31</sup> num estudo do tipo caso-controlo, salienta a maior probabilidade de homens com enfarte de miocárdio ou que morreram de doença coronária serem abstémios totais do que os respectivos controlos (que são indivíduos escolhidos aleatoriamente da mesma população, do mesmo sexo e com idades semelhantes). Após controlo de todos os possíveis factores interferentes, pessoas em todas as categorias de consumo tinham, no mínimo, uma redução de 40% do risco de doença

coronária fatal e não fatal, quando comparados com os abstêmios. A redução de risco era sempre superior nas mulheres do que nos homens, em todas as categorias mas em nenhum dos géneros havia um efeito dose-resposta claro.

Concluem os autores que os resultados obtidos apoiam a hipótese de que o consumo moderado ou ligeiro de álcool reduz o risco de doença coronária. Os efeitos separados do vinho, cerveja e bebidas espirituosas foram estudados, não tendo sido encontradas diferenças. Os autores referem, no entanto, ser a capacidade do seu estudo em diferenciar entre as várias bebidas muito pequena.

Marmot e Brunner<sup>32</sup> reviram os vários estudos que até 1991 abordavam a relação entre consumo de álcool e risco de DCV. Nas figuras 8 e 9 apresentam-se os resultados encontrados para consumos moderados. Apesar das falhas que eventualmente cada estudo pode apresentar, é de salientar a consistência de resultados obtidos em populações tão distintas como a Norte-Americana, Japonesa ou Porto-Riquenha.

Referem um outro aspecto, já aqui citado e alvo de muitas críticas nos estudos efectuados que é a inclusão de indivíduos que deixaram de beber por problemas de saúde, na categoria dos não consumidores e assim aumentar a taxa de doença nesta categoria. No entanto, vários estudos conseguiram fazer a separação entre ex-consumidores e abstêmios totais e permitiram concluir que embora os primeiros apresentem um risco maior de mortalidade por DCV, essa diferença desaparecia após ajuste para os vários outros factores de risco conhecidos.

Uma variante do argumento supracitado é que os abstêmios terão uma saúde mais débil do que os consumidores, daí não consumirem habitualmente bebidas alcoólicas. Seriam essas condições de saúde as responsáveis pela maior taxa de DCV entre os abstêmios. Três argumentos são apresentados pelos autores para rebater esta explicação: Primeiro, muitos estudos excluem pessoas com evidência de doença não cardiovascular, e continuam a obter o mesmo tipo de relação entre consumo de álcool e risco de DCV; segundo, seria de admirar que para este pretenso grupo de pessoas doentes se verificasse apenas um risco de DCV aumentado e não o de outras doenças, mas os dados existentes indicam que se há um risco aumentado de outras doenças para os abstêmios, esse valor é menos pronunciado do que o obtido para DCV; terceiro, se pessoas com doenças pré-existentes são recrutadas como não consumidores para estudos de seguimento, isto seria responsável por maiores taxas de doença nos primeiros anos, com um abaixamento, à medida que o tempo ia passando.

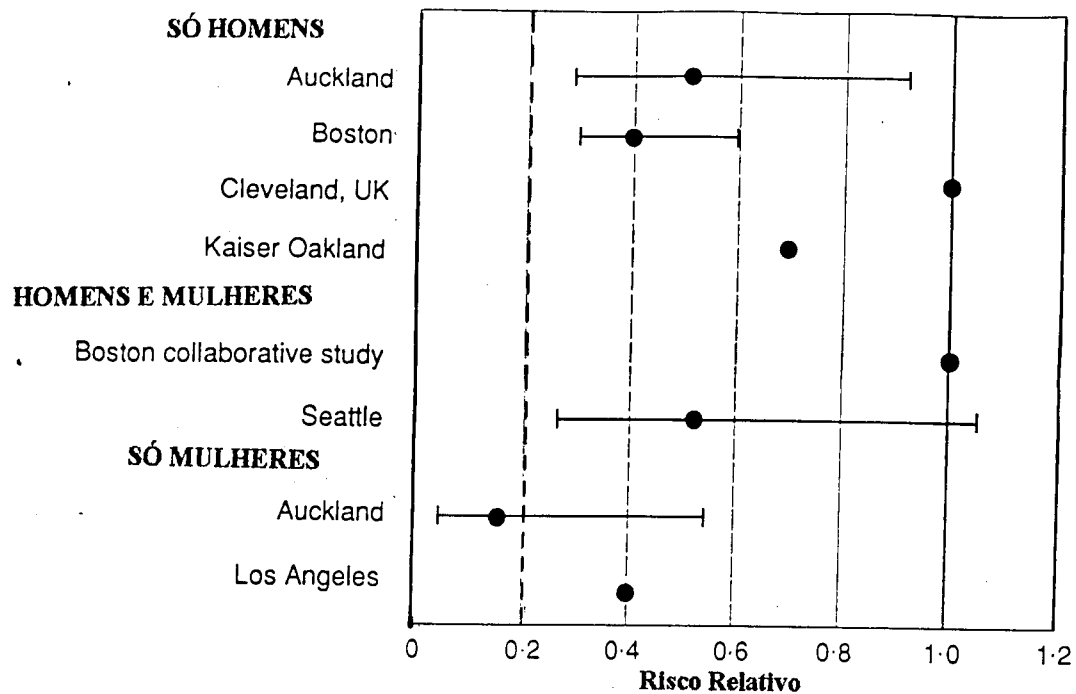


Figura 8 - Risco relativo de DCV nos consumidores moderados vs não consumidores em estudos de caso-controlo. As barras representam os intervalos de confiança (95%), quando disponíveis<sup>32</sup>. (Consumo moderado: <5 unidades de álcool diárias; quando se verificou mais de uma categoria de consumo, os valores foram calculados para a categoria mais elevada).

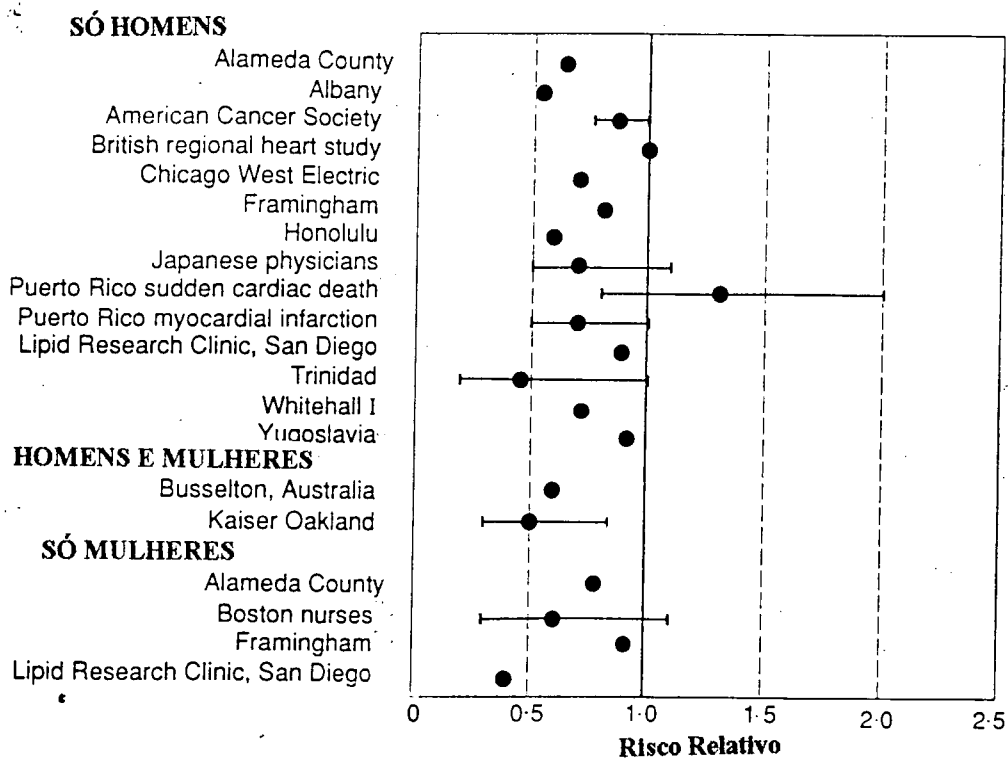


Figura 9 - Risco relativo de DCV nos consumidores moderados vs os não consumidores em estudos prospectivos. As barras representam os intervalos de confiança (95%), quando disponíveis<sup>32</sup>. (Consumo moderado: ≤5 unidades de álcool diárias).

Isto não acontece, havendo uma persistência de menores taxas de mortalidade entre os consumidores moderados, ao longo do tempo.

Este trabalho realça ainda a dificuldade de obtenção de dados correctos quanto ao consumo de álcool até porque os métodos de avaliação do mesmo variam bastante de estudo para estudo. Apesar disso, este aspecto parece ter pouco impacto nos resultados obtidos para risco de DCV e não parece afectar a capacidade dos vários trabalhos de demonstrar que o aumento de consumo de álcool se associa com um aumento de mortalidade por um conjunto de outras causas, como se representa na figura 10. Esta figura é uma representação típica dos resultados obtidos em muitos dos estudos efectuados e que enfatiza o efeito diferente que as bebidas alcoólicas parecem ter nos casos de DCV, em relação a outro tipo de situações.

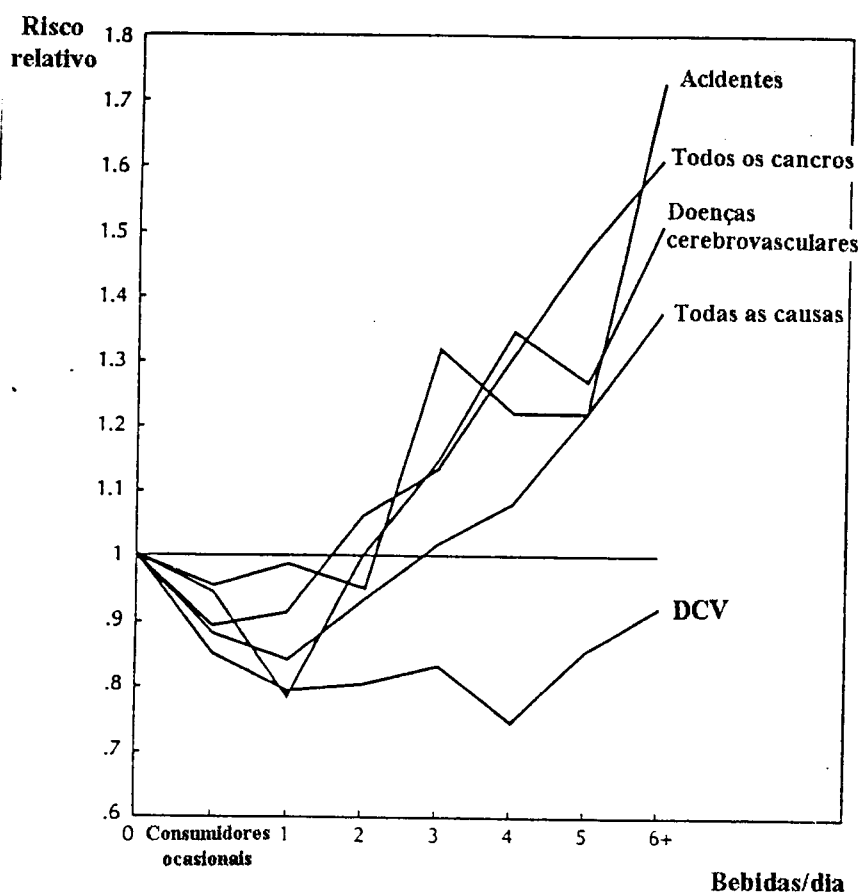


Figura 10 - Consumo de álcool e risco relativo de morte devida às quatro causas mais comuns e morte por todas as causas. Os valores obtidos foram ajustados para a idade e consumo de tabaco<sup>31</sup>.

Se um número significativo de consumidores fortes fosse classificado como não consumidor, seria difícil a interpretação dos resultados. No entanto, para este aspecto ser responsável pelo maior risco de DCV na categoria dos não consumidores seria necessário que o grau e a direcção das informações erróneas tivesse ocorrido com uma extensão muito semelhante num vasto leque de estudos e em diferentes condições sociais.

Em 1992, Renaud e Lorgeril<sup>33</sup> descrevem o chamado **Paradoxo Francês** que se caracteriza por uma baixa incidência de DCV em várias regiões de França em comparação com outros países industrializados, apesar das populações apresentarem valores de pressão arterial, colesterol sérico, índice de massa corporal e consumo de tabaco semelhantes. A região mediterrânica da França tem menor incidência de mortalidade por DCV do que as outras regiões e os autores sugerem que uma dieta do tipo mediterrânico (grande consumo de pão, vegetais, fruta e queijo) em conjunto com um consumo preferencial de vinho (20-30g/dia) são responsáveis por essa protecção.

Vários estudos ecológicos<sup>34,35</sup> apoiam a hipótese do Paradoxo Francês. A associação mais forte verificava-se para o consumo de vinho e essa relação era independente do consumo de tabaco, dieta e produto nacional bruto. Alguns autores comentam, ser o efeito superior do vinho em relação às outras bebidas, um artefacto devido a haver uma maior variação do consumo de vinho entre os vários países e quanto maior for a variação no consumo, maior será a probabilidade de se encontrar uma relação significativa entre consumo e risco de DCV.

Outros investigadores<sup>36</sup> acham que todas as bebidas estão relacionadas com um risco diminuído e que assim sendo, uma parte substancial do benefício obtido pelo consumo de bebidas alcoólicas parece advir do efeito do álcool mais do que dos outros componentes de cada tipo de bebida.

Mesmo assim continuam pouco claras as diferenças entre os vários tipos de bebidas, principalmente porque poucos trabalhos têm o poder estatístico suficiente para examinar cada tipo de consumo separadamente. As estimativas para os fortes consumidores variam muito; essa diferença pode relacionar-se em parte com discrepâncias nos intervalos de consumo utilizados nas várias investigações. Muitos estudos demonstrando maior protecção para esta categoria, tinham um número muito reduzido de indivíduos com um consumo muito forte em relação a estudos com conclusões contrárias. Além disso, quando existem dados obtidos por autópsia, é

difícil fazer a distinção entre uma morte por doença coronária e morte por cardiomiopatia induzida por forte consumo de álcool<sup>37</sup>, dado o estreitamento coronário ser típico das duas situações. De salientar que o consumo forte de álcool aumenta a pressão arterial, um factor de risco de DCV. Assim sendo, quando o consumo atravessa a barreira entre moderado e forte, os benefícios poderão começar a ser contrabalançados pelos efeitos adversos.

Alguns investigadores chamam a atenção para a possibilidade de os não consumidores serem diferentes dos consumidores em mais aspectos do que apenas o padrão de consumo de bebidas alcoólicas e estas diferenças poderem influenciar os seus valores de risco de DCV. É de salientar que foi encontrado um risco maior para os não consumidores, quer entre os Americanos de origem nipónica, entre os quais 47% caem nessa categoria, quer entre populações britânicas, que apenas têm 6% de não consumidores<sup>32</sup>. É bastante improvável que os aspectos que distinguem as duas categorias de consumidores sejam idênticas nas duas sociedades citadas. Para além disso, muitos estudos mostram que os consumidores têm tendência para apresentarem comportamentos que aumentam o seu risco pois os consumidores regulares apresentam uma maior percentagem de fumadores e, em geral, os consumidores fortes e moderados ingerem mais gorduras saturadas que os não consumidores e consumidores ligeiros. No entanto, após ajuste para os vários factores interferentes, o efeito final é reforçar a associação inversa entre consumo alcoólico e risco de DCV.

Estudos mais recentes<sup>29,27,36,38,39,40,41,42</sup> continuam a demonstrar uma curva em forma de U ou J para a relação entre consumo de bebidas alcoólicas e risco de DCV, tanto para homens como para mulheres. Verifica-se igualmente um aumento da concentração sérica de HDL como o consumo com aproximação, em vários casos, a situações de relação dose-resposta. Não há consenso sobre qual a fracção de HDL que sofre aumento mais pronunciado. Parece haver também aumento dos níveis de apoA-I. Para consumos elevados parece haver uma diminuição dos níveis de LDL.

Em conclusão, de todos os trabalhos consultados a grande maioria aponta para um efeito benéfico do consumo moderado de bebidas alcoólicas.



### III. ATEROSCLEROSE E ANTIOXIDANTES

#### III.1. PEROXIDAÇÃO LÍPIDICA

É um dos principais mecanismos responsáveis pelas lesões celulares e mesmo morte e apresenta-se esquematizado na figura 11. Pode ser iniciada por um radical livre e os peróxidos lípidicos que se formam podem, por sua vez, fragmentar dando vários produtos como sejam mais radicais, hidrocarbonetos e aldeídos voláteis, extremamente tóxicos para as células<sup>43</sup>.

---

<b>Iniciação:</b>	Produção de L· ⇔ Poderá ser pelo ataque de um radical como o hidróxilo: $LH + HO· \rightarrow H_2O + L·$
<b>Propagação:</b>	$L· + O_2 \rightarrow LOO·$ $LOO· + LH \rightarrow LOO· + L·$
<b>Terminação:</b>	$LOO· + LOO· \rightarrow$ Produtos moleculares

---

Figura 11 - Peroxidação lípidica, estando representadas as quatro reacções elementares (LH = lípido molecular; L· = radical lípidico centrado num carbono; LOO· = radical peróxido lípidico).

Os produtos da peroxidação lípidica (radicais peróxido e hidroperóxidos, entre outros) podem participar em reacções em cadeia, cujas consequências se resumem na tabela 2.

Tabela 2 - Potenciais consequências da peroxidação dos lípidos dos tecidos.

- 
- \*Alteração das funções membranares (receptores, enzimas, permeabilidade)
  - \*Modificação da LDL
  - \*Alteração das funções plaquetárias
  - \*Modificação das funções dos macrófagos ("scavenging" da LDL, modulação imunitária)
  - \*Alteração da cascata do ácido araquidónico
  - \*Polimerização das proteínas
  - \*Promoção da aterogénese
  - \*Mutações do DNA
-

Ao longo da última década, vários estudos têm tentado averiguar o papel da peroxidação lípidica na aterogénese. A peroxidação lípidica parece estar envolvida nas modificações de natureza oxidativa da LDL que como já foi referido, são mecanismos potentes que aumentam a sua aterogenicidade.

É também significativo o facto da LDL oxidada (oxLDL) conter produtos da peroxidação lípidica extremamente citotóxicos que vão ter uma acção quimiotáctica sobre os monócitos e plaquetas, exercendo também um efeito citotóxico nas células endoteliais, uma proliferação das células musculares com libertação de colagénio, elastina e proteoglicanos. A oxLDL depositada nas paredes arteriais poderá libertar estes compostos bioactivos de um modo contínuo, irritando a camada endotelial e inibindo o efeito vasodilatador do factor relaxante derivado do endotélio e assim contribuir para a evolução das lesões ateroscleróticas. A oxLDL poderá também causar distúrbios na homeostase eicosanoide e agregação plaquetária assim como na expressão dos genes<sup>44,45</sup>.

### III.1.1. MODIFICAÇÃO OXIDATIVA DA LDL

A oxidação da LDL comporta vários aspectos que se esquematizam na figura 12. As alterações oxidativas da LDL resultam na modificação química, por produtos da peroxidação lípidica, de partes da apoB-100 das quais os grupos  $\epsilon$ -amino das lisinas são particularmente susceptíveis. As partículas modificadas deste modo já não se ligam aos receptores normais da LDL mas sim aos receptores "scavenger"<sup>46</sup>.

Cada partícula de LDL contém cerca de 2200 moléculas de colesterol (livre + esterificado) e cerca de 2600 moléculas de ácidos gordos, dos quais cerca de metade são ácidos poliinsaturados (PUFAs), com uma presença predominante dos ácidos linoleico (18:2), araquidónico (20:4) e docosahexanoico (22:6). A LDL é, portanto, rica não só em colesterol mas também em PUFAs que são moléculas muito susceptíveis à peroxidação lípidica, e todos são protegidos pela presença de vários antioxidantes. O principal é o  $\alpha$ -tocoferol, com uma média de sete moléculas por partícula de LDL. Outros potenciais antioxidantes na LDL são o  $\gamma$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, licopeno, criptoxantina, cantaxantina, luteína, zeaxantina, fitoflueno, retinoides e ubiquinol-10, mas encontram-se em quantidades 20 a 300 vezes inferiores ao  $\alpha$ -tocoferol. A proporção molar entre PUFAs e antioxidantes



O mecanismo de oxidação da LDL *in vivo* é ainda matéria de especulação (embora se considere a intervenção das lipooxigenases), assim como a identidade do radical iniciador do processo. É geralmente aceite que radicais centrados em átomos de oxigénio e certas células como os macrófagos e neutrófilos geram grandes quantidades de anião superóxido, como produto das suas actividades metabólicas e como parte da sua função biológica, respectivamente. O radical hidróxilo extremamente reactivo, tem uma vida curta e é pouco provável que cause dano à LDL mas existem outras espécies como os radicais hidroperóxilo ( $\text{HO}_2\cdot$ ), que já podem exercer a sua acção nefasta. A LDL contém pequenas quantidades de peróxidos lípidicos endógenos que são suficientes para, na presença de iões de metais de transição, catalisar a formação de radicais alcóxilo ( $\text{RO}\cdot$ ) e peróxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ) que propagam o processo de peroxidação. Na ausência de iões metálicos livres, os aniões superóxido têm pequeno efeito na LDL mas podem favorecer significativamente a acção dos iões cúpricos que são bons estimuladores da peroxidação da LDL<sup>46,47</sup>.

A oxidação da LDL começa quando um radical iniciador abstrai um átomo de hidrogénio de um dos PUFAs. Uma vez formado, o radical centrado num átomo de carbono do PUFA reage muito rapidamente com o oxigénio molecular dando um radical peróxilo lípidico e um novo radical PUFA. É esta última reacção que propaga a cadeia de peroxidação lípidica. Se não ocorre nenhuma terminação de cadeia, um único acontecimento de iniciação pode converter todos os PUFAs em hidroperóxidos lípidicos. O tamanho preciso da cadeia, isto é, o número de PUFAs oxidados em relação a cada radical iniciador depende de muitos factores especialmente dos antioxidantes.

Os antioxidantes da LDL "competem" com a propagação da cadeia por muito eficientemente fazerem o "scavenging" dos radicais peróxilo lípidicos. Isto pode ser demonstrado *in vitro* pois se a LDL for exposta a condições pró-oxidantes antes que quantidades substanciais de hidroperóxidos lípidicos se formem, a LDL fica depletada dos seus antioxidantes, com o  $\alpha$ -tocoferol a ser consumido primeiro e o  $\beta$ -caroteno em último - é a chamada fase "lag" da oxidação da LDL. Só quando a LDL perde quase todos os seus antioxidantes é que a fase de propagação tem início e os seus PUFAs são rapidamente oxidados a hidroperóxidos lípidicos. Segue-se a fase de decomposição na qual os hidroperóxidos originam uma série de produtos, incluindo produtos finais estáveis como aldeídos, hidrocarbonetos gasosos, epóxidos e alcoóis. Esta sequência de acontecimentos foi demonstrada para a oxidação de LDL iniciada

pelos macrófagos e íões de cobre e independentemente do modo de iniciação<sup>4</sup>. Na última fase de decomposição, a oxLDL tem mais ou menos as mesmas propriedades químicas e biológicas que se apresentam na tabela 3.

Tabela 3 - Propriedades da oxLDL comparadas com as da LDL nativa<sup>15 \*</sup>

- ◆Taxa aumentada de entrada e degradação pela via "scavenger", levando à formação de células "foam"
- ◆Taxa reduzida de entrada via receptores de LDL
- ◆Carga negativa aumentada
- ◆Densidade aumentada (poderá chegar a 1,07 ou 1,08)
- ◆Conteúdo aumentado de lisolecitina
- ◆Conteúdo diminuído de PUFAs devido à oxidação
- ◆Conteúdo aumentado de formas oxidadas de colesterol
- ◆Fragmentação da apoB-100; conteúdo diminuído de lisina, histidina e prolina
- ◆Actividade quimiotáctica para os monócitos humanos circulantes
- ◆Citotoxicidade (na ausência de soro)

\* As modificações oxidativas foram efectuadas por incubação com células endoteliais com 10-100µg de LDL por mililitro de meio Ham F-10 (protein free), durante 20-24h a 37°C. Resultados semelhantes podem ser obtidos por incubação com culturas de células de músculo liso ou macrófagos de peritoneu de rato, ou por incubação durante várias horas com 5µM de íões cúpricos na ausência de células.

Um pré-requisito para a geração de uma partícula de LDL modificada de tal modo que seja internalizada pelos macrófagos é a decomposição dos peróxidos lípidicos em aldeídos. O malondialdeído (MDA), o 4-hidroxinonenal (4-HNE) e provavelmente outros aldeídos gerados na partícula de LDL parecem serem responsáveis pela criação de novos epítopes na apoB-100, por ligação covalente às cadeias laterais dos aminoácidos, reconhecíveis pelos receptores "scavenger". A aminoguanidina, um composto com grande afinidade para os aldeídos, previne a alteração da apoB-100 mediada pela oxidação da LDL pelas células endoteliais ou íões cúpricos. Epítopes de apoB-100, característicos da oxLDL têm sido encontrados em lesões arteriais e a LDL extraída das paredes arteriais têm características

semelhantes às da oxLDL. Autoanticorpos contra proteínas modificadas pelo MDA ou 4-HNE (talvez apoB) estão presentes no plasma humano<sup>44,46</sup>.

### III.2. ANTIOXIDANTES BIOLÓGICOS E MECANISMOS DE ACÇÃO

Uma série de enzimas e compostos designados por defesas antioxidantes inibem a iniciação e/ou propagação dos danos oxidativos nas biomoléculas. A importância relativa de cada um dos vários antioxidantes *in vivo*, isto é, as suas contribuições relativas para a capacidade antioxidante total não estão bem compreendidas. Além disso, os antioxidantes poderão actuar cooperativamente *in vivo* para dar maior protecção ao organismo contra os danos dos radicais, com um efeito final que não seria possível obter pela actuação solitária de cada um deles<sup>43,48</sup>.

Os antioxidantes podem ser divididos em dois grupos de acordo com o seu modo de acção: antioxidantes preventivos e antioxidantes bloqueadores de cadeia.

Na tabela 4 apresenta-se uma das classificações possíveis das defesas antioxidantes biológicas.

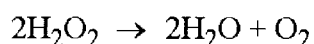
Tabela 4 - Sistemas defensivos antioxidantes segundo a sua localização celular.

INTRACELULAR	MEMBRANAR	EXTRACELULAR
Superóxido dismutase	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalase	$\beta$ -caroteno	Transferrina
Peroxidase	Ubiquinol-10	Lactoferrina
DT-diaforase		Albumina
Glutathiona (reduzida)		Haptoglobulinas
Proteínas quelantes de metais		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Sistemas reparadores de DNA		Vitamina E
Vitamina C		

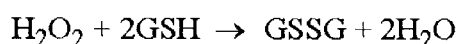
### III.2.1 ANTIOXIDANTES PREVENTIVOS

O precursor molecular da fase de iniciação da peroxidação é geralmente o  $H_2O_2$  ou um peróxido lípidico. Os antioxidantes preventivos reduzem a taxa à qual as novas reacções em cadeia são iniciadas. Este efeito poderá ser levado a cabo de várias maneiras, incluindo a conversão dos hidroperóxidos em compostos mais estáveis como alcoóis e aldeídos ou pela remoção ou inactivação dos iões metálicos que participam nestas reacções<sup>43</sup>.

Nos sistemas vivos, a conversão dos hidroperóxidos está a cargo da enzima catalase (CAT; EC 1.11.1.6) que catalisa a reacção:



e da glutathiona peroxidase (GPX; EC 1.11.1.9), que contém selénio e que cataliza a oxidação da glutathiona (GSH)<sup>49,50</sup>:



As proteínas plasmáticas transferrina e albumina, previnem a decomposição catalítica dos peróxidos pelo sequestro dos iões férricos e cúpricos, respectivamente. A lactoferrina, segregada pelas células fagocíticas actua de um modo semelhante. A ceruloplasmina, igualmente uma proteína plasmática, actua como antioxidante preventivo ao promover a oxidação do  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ , que apresenta uma actividade catalítica inferior. As haptoglobulinas são proteínas com a capacidade de se ligarem à hemoglobina e assim retardar os seus efeitos estimuladores na peroxidação pela libertação de ferro durante a sua decomposição<sup>43,50</sup>.

Os carotenoides são potentes "quenchers" do oxigénio singlete, inactivando esta espécie química assim como outros radicais, que de outro modo iriam iniciar reacções prejudiciais como a peroxidação lípidica. Têm também uma significativa actividade sequestradora de radicais<sup>43,51</sup>.

### III.2.2. ANTIOXIDANTES BLOQUEADORES DE CADEIA

Este tipo de antioxidantes reage directamente com os radicais.

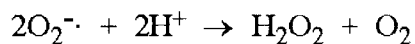
Entre estas defesas antioxidantes conta-se a vitamina E ou tocoferol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) que reagindo com vários radicais livres com a produção concomitante do radical cromaxilo (vit.E-O) inibe as reacções de propagação. O radical cromaxilo é capaz de reagir consigo próprio ou com outros antioxidantes fisiológicos como o ácido ascórbico, que contribui assim para a regeneração da vitamina E e pode também reagir com radicais peróxilo e o oxigénio singlete. Esta interacção entre as vitaminas E e C é um bom exemplo das interacções entre os vários antioxidantes bloqueadores de cadeia no plasma e que podem ser importantes para uma eficiente manutenção dos níveis de peroxidação lípidica. A vitamina E só pode sequestrar radicais peróxilo na fase lípidica, enquanto que a vitamina C, urato e glutatona só o podem fazer na fase aquosa. No entanto, se a vitamina E está presente na fase lípidica, a vitamina C pode regenerar a E a partir do radical  $\alpha$ -tocoferoxilo<sup>48,49,50</sup>.

O ácido úrico é um importante antioxidante parecendo ter uma melhor capacidade de "aprisionamento" de radicais peróxilo, sendo também um bom quelante de iões metálicos em formas que não promovem reacções de radicais. Possui alguma actividade como antioxidante preventivo ao proteger o ascorbato da oxidação por iões cúpricos e da oxidação induzida pelo ferro. Há evidências de que o urato "estabiliza" o ascorbato no plasma humano sem consumo paralelo aparente de urato.<sup>43,48,49</sup>

A glutatona protege os lípidos contra a peroxidação por reagir com radicais livres e decompôr peróxidos lípidicos. É também importante na defesa contra a radiação ionizante, reduzindo hidroperóxidos (lípidicos, nucleotídicos ou simplesmente  $H_2O_2$ ), numa reacção catalisada pela GSH peroxidase<sup>43,48,49</sup>.

Nas condições fisiológicas normais, o radical da fase aquosa mais comum é, provavelmente a anião superóxido,  $O_2^{\cdot-}$ , que se encontra em equilíbrio com o seu ácido conjugado, o radical hidroperóxilo,  $HO_2^{\cdot}$ , que sendo muito mais reactivo, é mais deletério. A enzima superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) ao catalisar a dismutação dos aniões superóxido:





desempenha um papel muito importante entre as defesas antioxidantes. É também considerada um antioxidante bloqueador de cadeia<sup>43,49</sup>. A forma presente no citosol dos eucariotas contém cobre e zinco, designando-se por CuZnSOD.

### III.3. ANTIOXIDANTES BIOLÓGICOS E ATEROSCLEROSE

O papel da oxLDL na aterogénese está bem definido. A susceptibilidade da LDL ao *stress* oxidativo depende do balanço entre o seu conteúdo em ácidos poliinsaturados e antioxidantes, em particular, a vitamina E.

Vários estudos epidemiológicos e não só<sup>51,52,53,54,55,56</sup>, demonstram uma relação inversa entre níveis de vitaminas C e E e mortalidade devida a doença isquémica cardíaca e doença coronária. Esses trabalhos apontam para uma interacção cooperativa dos vários antioxidantes, donde um certo nível de vitamina E poderá parecer adequado/protector quando os níveis de todos os outros antioxidantes são suficientes, mas quando não é este o caso o efeito protector da mesma concentração de vitamina E poderá não ser adequado. Apesar de vários antioxidantes serem inibidores da oxidação da LDL *in vitro*, apenas o probucol, o  $\alpha$ -tocoferol e o ascorbato parecem ter essa acção *in vivo*.

De todos os trabalhos referidos torna-se evidente o papel protector dos antioxidantes, em especial a vitamina E, contra as doenças cardiovasculares.

## IV. EFEITOS ESPECÍFICOS DO VINHO

### IV.1. EVIDÊNCIAS EPIDEMIOLÓGICAS

Tendo por base dados da OMS, St.Leger<sup>35</sup> encontrou uma forte correlação negativa entre mortalidade por DCV e consumo de vinho em dezoito países desenvolvidos, como se ilustra na figura 13. A grande maioria dos estudos<sup>57,58</sup> corrobora estes dados, embora também haja alguns dizendo o contrário.

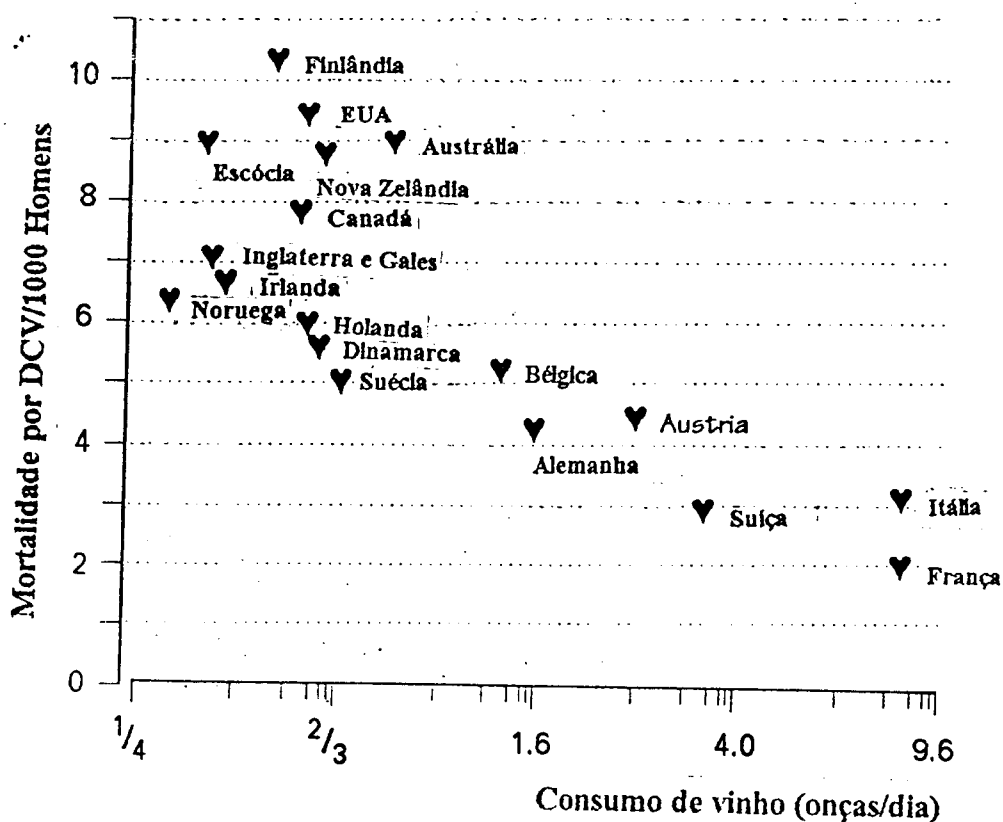


Figura 13 - Relação inversa entre consumo médio de vinho *per capita* e mortalidade por DCV em dezoito países ocidentais<sup>35</sup>.

Nanji *et al*<sup>59</sup> sugerem haver uma redução da mortalidade anual por DCV, em países como os Estados Unidos, imputável a um aumento desproporcionado da percentagem de consumo de vinho em relação a outros tipos de bebidas alcoólicas, enquanto que em países como a Itália, França e Hungria se nota um aumento da

mortalidade pelas mesmas causas, aumento esse relacionado com um pequeno decréscimo e/ou redução do consumo de vinho.

Alguns autores<sup>57,58</sup> chamam a atenção para as diferenças de estilos de vida entre os consumidores com preferência para um tipo de bebida, sugerindo que o consumo de vinho poderá reflectir mais consciência do que é saudável e aderência a dietas que favorecem a redução de mortalidade por DCV e não excluem a hipótese de o efeito protector mais poderoso do vinho se dever a um maior consumo e melhor nutrição nos países com grande consumo dessa bebida.

Marmot *et al*<sup>32</sup> tinham anteriormente feito referência a este aspecto social do consumo de vinho, que por si só está associado a um risco inferior. Citam no entanto, alguns estudos em que essa vertente tinha sido tomada em consideração, e nos quais o aparente papel protector do vinho foi encontrado nas mais variadas culturas, entre as quais os factores associados com as classes mais altas tendem a ser diferentes.

A população do sul de França apresenta um consumo de gorduras saturadas, um nível de colesterol sérico e taxas de risco semelhantes aos de populações como a finlandesa ou norte-americana mas, no entanto, a incidência de morte por DCV é bastante inferior (tabela 5). A explicação para este fenómeno, conhecido como o Paradoxo Francês<sup>33</sup>, foi atribuída à dieta, rica em vegetais, fruta, pão, queijo e em especial, vinho e que se designa por dieta do tipo Mediterrânico (tabela 6).

Os autores, utilizando dados da OMS e da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico) referentes a dezassete países, mostraram que dos diversos alimentos apenas as gorduras dos produtos lácteos têm uma associação positiva com a taxa de mortalidade por DCV, com um valor de correlação significativamente alto ( $r=0,73$ ,  $p<0,001$ ), quer para populações mistas (figura 14), quer para homens e mulheres, separadamente. O gráfico apresentado evidencia o Paradoxo Francês ao situar a França afastada da linha de regressão. O Reino Unido aparece como o paradoxo oposto.

Os investigadores utilizaram modelos multivariáveis e os dados anteriores para demonstrar ser o vinho o único produto alimentar que se correlaciona de um modo significativo com mortalidade por DCV, para além das gorduras lácteas (figura 15). Neste tipo de análise, o consumo de vinho tem um sinal negativo, indicando um papel protector. Neste gráfico é possível observar que a França se situa perto da linha de regressão, já não constituindo um paradoxo em relação aos outros países.

Tabela 5 - Mortalidade anual por DCV e factores de risco em populações MONICA\*  
(faixa etária: 35-64 anos)<sup>33</sup>

Centro MONICA	Mortalidade anual por DCV/10000 indivíduos		Concentração média de colesterol (mg/dl)		Pressão sistólica média (mmHg)		Percentagem de fumadores regulares (%)	
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
Japão	33	9	---	---	---	---	---	---
Beijing, China	49	27	163	166	130	129	50	16
Toulouse, França	78	11	230	224	133	128	37	17
Strasbourg, França	102	21	218	216	145	137	34	15
Lille, França	105	20	252	248	139	135	39	11
Suíça	103	17	248	232	132	126	32	21
Stanford, EUA	182	48	209	205	128	124	40	37
Belfast, RU	348	88	232	236	135	132	34	33
Glasgow, RU	380	132	244	248	138	134	52	50

\* O projecto MONICA é um sistema mundial de monitorização de DCV, organizado pela OMS. Os dados apresentados referem-se ao ano de 1989.

Tabela 6 - Mortalidade por DCV, colesterol HDL e dieta em homens de três centros  
MONICA franceses<sup>33</sup>.

	ESTRASBURGO	TOULOUSE	LILLE
Mortalidade por DCV/10 <sup>5</sup> homens	102	78	105
Conc. média colesterol HDL (mg/dl)	45	52	60
Dieta (g/dia):			
Pão	164	225	152
Vegetais	217	306	212
Fruta	149	238	160
Manteiga	22	13	20
Queijo	34	51	42
Gorduras vegetais	16	20	15
Vinho	286	383	267

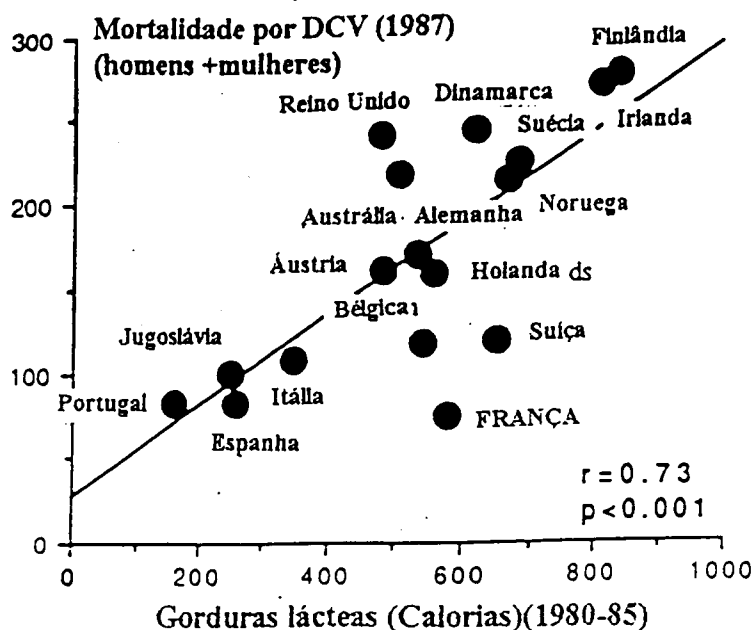


Figura 14 - Relação entre taxa de mortalidade por DCV (valor médio para homens e mulheres) e consumo de gorduras lácteas, em países que reportam consumo de vinho<sup>33</sup>.

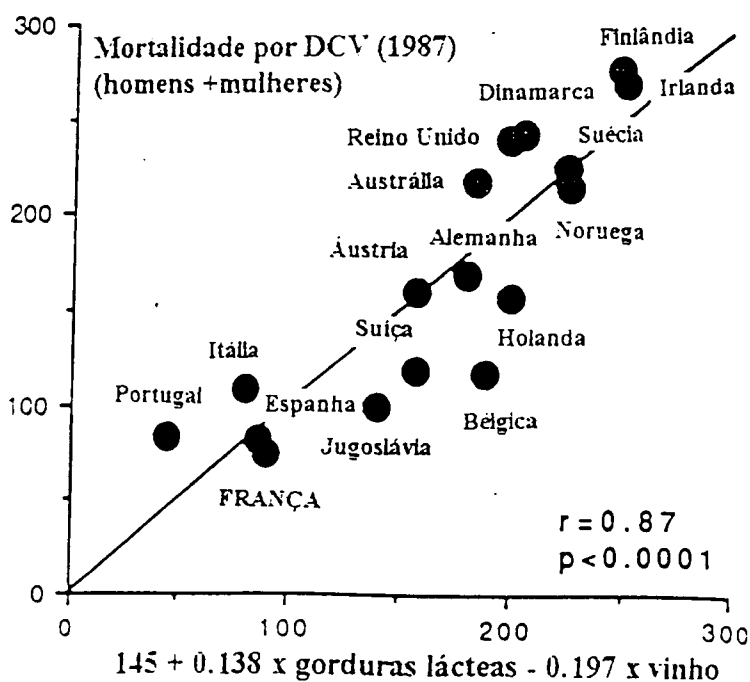


Figura 15 - Relação entre mortalidade por DCV (valor médio para homens e mulheres) e consumo de gorduras lácteas e vinho, em países que reportam consumo de vinho<sup>33</sup>.

Estes resultados sugerem ser o efeito "distanciador" da linearidade causado pela ingestão de gorduras lácteas, contrabalançado pelo consumo de vinho.

Outra ilação que se pode tirar da comparação das figuras 14 e 15 é que o efeito protector do vinho é também válido para a Suíça e outros países industrializados. Na figura 15 o Reino Unido aproxima-se da linearidade, provavelmente pelo baixo consumo de vinho nesse país.

## **IV.2 POSSÍVEIS MECANISMOS PARA O PAPEL PROTECTOR DO VINHO**

Como já foi referido o consumo moderado de vinho parece ter efeitos protectores em homens, mulheres, idosos e fumadores devido a um aumento dos níveis de HDL, a uma redução dos níveis das lipoproteínas aterogénicas, uma redução do *stress* e possivelmente uma redução da actividade plaquetária.

### **IV.2.1. ACÇÃO DO ÁLCOOL NOS MECANISMOS HEMOSTÁTICOS**

Para além da infiltração lipídica nas artérias coronárias, a trombose é outro dos factores de enfarte de miocárdio. Associações entre concentrações aumentadas de três factores hemostáticos (fibrinogénio, factor VII e PAI-1) e DCV têm sido demonstradas em estudos epidemiológicos<sup>60</sup>. Vários trabalhos apontam para que uma parte do efeito protector das bebidas alcoólicas e portanto do vinho, possa ser mediado por mecanismos hemostáticos. O consumo ligeiro ou moderado de álcool reduz de uma forma aguda a agregação plaquetária e, por inferência, o risco de trombose<sup>23,25,62</sup>. Há igualmente indicações de reduções, *in vivo* e *in vitro*, dos factores de coagulação e alterações do metabolismo dos eicosanoides, levando a uma redução da síntese do tromboxano acoplada a uma síntese aumentada de prostaciclina vasodilatária. Estes são factores com um grande potencial na redução de risco de DCV entre consumidores moderados de álcool, dado uma agregação plaquetária aumentada ser um forte risco para uma maior incidência de doença cardiovascular<sup>24</sup>.

O etanol também modula a fibrinólise, reduzindo assim a capacidade de coagulação. Experiências envolvendo consumo de álcool durante curtos espaços de tempo, demonstraram concentrações aumentadas de plasminogénio e activadores do plasminogénio e t-PA<sup>24,63</sup> sendo essa associação independente de alterações nos lípidos e lipoproteínas.

#### IV.2.2. COMPONENTES PARTICULARES DO VINHO E SUA ACÇÃO

Os alimentos de origem vegetal, incluindo as bebidas, exercem o seu efeito benéfico através de uma redução do consumo de gorduras e fornecendo um melhor equilíbrio de ácidos gordos. Para além disso fornecem um conjunto de substâncias bioactivas que poderão reduzir a ocorrência de fenómenos oxidativos como a peroxidação lipídica e assim retardar o aparecimento de doenças crónicas, entre elas, o cancro e doenças cardíacas.

Os tecidos vegetais são os principais produtores de  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e carotenoides para além de uma grande variedade de compostos fenólicos. Muitos alimentos de origem vegetal contêm vários flavonoides hidroxilados e outros compostos fenólicos em quantidades que variáveis<sup>64</sup>. Os flavonoides geralmente ocorrem como O-glicosídeos com açúcares ligados no C3 (figura 16) e consistem principalmente em antocianinas, flavonois, flavonas, catequinas e flavanonas. Demonstram uma grande variedade de efeitos bioquímicos e farmacológicos, incluindo acções anti-inflamatórias, anti-alérgicas, antioxidantes, anti-microbianas e inibidoras da agregação plaquetária<sup>65,66,67,68</sup>.

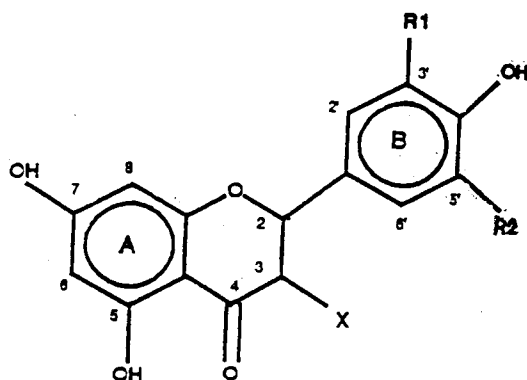


Figura 16 - Estrutura dos flavonoides: Flavonois, X=OH; quercetina, R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H; kaempferol, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H; miricetina, R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=OH; flavonas, X=H; apigenina, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H; luteolina, R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H.

São necessários mais estudos epidemiológicos para dar suporte aos dados experimentais existentes sobre as variadas acções biológicas destes compostos. É, no entanto, de referir o estudo epidemiológico levado a cabo por Hertog *et al*<sup>69</sup> que vem dar apoio às evidências experimentais da inibição *in vitro* da oxidação da LDL. Neste

estudo foi possível encontrar uma relação inversa entre consumo de flavonoides e mortalidade por DCV, assim como incidência de enfarte do miocárdio, mesmo após ajuste para os vários factores de risco.

Fontes importantes dos flavonoides são os vegetais, frutas e bebidas (sumos, vinhos, chás), estas últimas responsáveis por cerca de 25-30% da ingestão diária.

#### IV.2.2.1. OS COMPOSTOS FENÓLICOS DO VINHO

Na composição dos vinhos, os compostos fenólicos correspondem a cerca de 0,1-0,2% do peso total<sup>70</sup>. A maior diferença entre o vinho tinto e branco é um maior conteúdo de constituintes fenólicos do primeiro<sup>24</sup>, principalmente de flavonoides (cerca de 20 vezes mais) - tabela 7.

Tabela 7 - Estimativa do conteúdo fenólico (mg/dl) para vinhos comerciais jovens<sup>70</sup>

	Vinhos de mesa		Vinhos doces	
	Branco	Tinto	Branco	Tinto
Não-flavonoides, Total	165	200	145	190
Fenóis voláteis	1	5	1	5
Tirosol	14	15	9	10
Hidroxibenzoatos	10	40	5	35
Hidroxicinamatos	140	140	130	130
<b>Flavonoides, Total</b>	<b>35</b>	<b>1000</b>	<b>60</b>	<b>700</b>
Catequinas	25	75	50	80
Antocianinas e derivados	0	400	0	300
Outros flavon. monoméricos	0	25	5	20
Taninos di- e poliméricos	5	500	5	300
<b>Fenóis totais</b>	<b>200</b>	<b>1200</b>	<b>205</b>	<b>890</b>

Os bagos de uva, vinhos e subprodutos dos bagos têm grandes quantidades de compostos fenólicos, especialmente flavonoides, com concentrações de 1000-1800 mg/ml<sup>64</sup>. Resultados obtidos com vinho desalcoholizado mas com todos os seus



compostos fenólicos demonstram que estes colectiva e individualmente, são 10-20 vezes mais poderosos que a vitamina E, (numa base equimolar), na protecção da LDL humana contra a oxidação catalisada pelo cobre<sup>71</sup>. As células endoteliais dos vasos sanguíneos produzem um factor (provavelmente o óxido nítrico), que causa a relaxação do músculo liso e que se pensa ser um importante mecanismo das defesas contra a aterosclerose. *In vitro*, os compostos fenólicos do vinho favorecem a produção do óxido nítrico e causam a relaxação vascular de anéis de aorta<sup>72</sup>.

Os consumidores de fruta e vegetais ingerem uma quantidade razoável de flavonoides, porém a ingestão de dois copos de vinho tinto por dia, aumenta o conteúdo de flavonoides da dieta em 40%. De notar também que a biodisponibilidade nas frutas e vegetais nunca foi devidamente comprovada dado os flavonoides só muito recentemente terem sido medidos no soro. Além disso os flavonoides estão presentes em formas poliméricas e glicosídicas complexas que não serão facilmente degradadas pelos sucos digestivos e se o forem, a sua relativa insolubilidade em meio aquoso poderá limitar ou até evitar a sua absorção. Em contrapartida, durante a fermentação do vinho esses agregados são quebrados em formas monoméricas e os 10% ou mais de álcool do vinho ajudarão a manter os flavonoides em solução estável na garrafa e muito provavelmente no intestino humano<sup>24</sup>.

Experiências *in vivo* mostram igualmente um aumento do potencial antioxidante plasmático (determinado por uma técnica de quimioluminescência) com o consumo de vinho tinto<sup>73</sup>. Neste trabalho indivíduos normais ingeriram vinho tinto, branco e doses altas de vitamina C. Nove indivíduos que ingeriram 300ml de vinho tinto apresentaram um aumento de 18% da capacidade antioxidante do soro uma hora após a ingestão e de 11%, duas horas após. A mesma quantidade de vinho branco produziu um aumento de 4% e 7%, respectivamente. A ingestão de 1000mg de ácido ascórbico (5,7mmol), por quatro indivíduos, produziu um aumento de 22%, uma hora após e de 29%, duas horas após. Paralelamente foram realizados ensaios *in vitro* da capacidade antioxidante de vários sumos de fruta, vinho branco e tinto, com os valores mais altos a serem obtidos com esta última bebida (tabela 8).

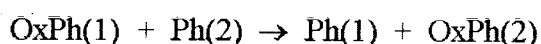
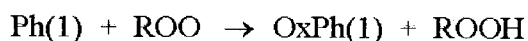
Não parecem existir dados sobre o mecanismo ou mecanismos precisos que estão na origem do aumento de potencial observado, nem sobre os polifenóis particulares que poderão estar envolvidos neste tipo de fenómeno.

Tabela 8 - Capacidade antioxidante total de várias bebidas<sup>73</sup> (os sumos utilizados eram recém-espremidos).

BEBIDA	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE/ $\mu\text{mol/l}$
Vinho tinto (nove variedades)	10000-20727
Vinho branco (quatro variedades)	872-1284
Sumo de maçã	7890
Sumo de laranja	2000
Sumo de uva	680

Kanner *et al*<sup>64</sup> estudaram o efeito antioxidante dos compostos fenólicos de vinhos na catálise da peroxidação lipídica por substâncias biológicas como a mioglobina, citocromo c, ascorbato de ferro e iões de cobre, tendo sido obtidos valores de inibição expressos em  $I_{50}$  (=concentração de uma substância que produz uma inibição de 50%) com concentrações de 0,2, 0,35 e 0,9 $\mu\text{g}$  de fenóis/l, respectivamente. Outra determinação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do vinho foi efectuada utilizando um sistema contendo LDL oxidada *ex vivo* por iões cúpricos e comparando com o efeito obtido com o  $\alpha$ -tocoferol. A oxidação era inibida de um modo mais eficiente pelos polifenóis ( $I_{50}$  inferior a 1 $\mu\text{M}$ ) do que pelo tocoferol ( $I_{50}$  igual a 2 $\mu\text{M}$ ).

Em vários dos sistemas usados pelos autores, os compostos fenólicos actuaram com um  $I_{50}$  inferior a 1 $\mu\text{M}$ . Esta maior actividade poderá ser atribuída a um efeito sinérgico da mistura de compostos fenólicos. Vários antioxidantes muito activos poderão interactuar preferencialmente com radicais ferrilo ( $\text{X-Fe}^{4+}=\text{O}$ ) ou radicais livres. Os compostos fenólicos resultantes (OxPh) são subsequentemente reduzidos e possivelmente regenerados por outros compostos fenólicos menos activos<sup>64</sup>.



Resumem-se na tabela 9 algumas das propriedades dos flavonoides.

Tabela 9 - Algumas propriedades biológicas dos flavonoides e outros compostos dos vinhos e alimentos vegetais<sup>39</sup>.

- 
- ◆ Scavenging de radicais livres
  - ◆ Acções antioxidantes – prevenção da peroxidação lípidica
  - ◆ Protecção contra a oxidação da LDL
  - ◆ Inibição de enzimas oxidativas e hidrolíticas (envolvidas na cascata do ácido araquidónico):
    - Fosfolipase A<sub>2</sub>
    - Ciclooxigenase
    - Lipooxigenase
  - ◆ Acções anti-inflamatórias
- 

#### IV.2.2.2. OS COMPOSTOS FENÓLICOS E A ATEROGÉNESE

As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos estão bem documentadas. Frankel<sup>71</sup> demonstrou que o vinho tinto reduz a oxidação *ex vivo* da LDL humana. A adição de 4 e 10  $\mu\text{M}$  de polifenóis extraídos do vinho, causava 60 e 85% de inibição da oxidação da LDL, respectivamente. Extractos de vinho tinto, sem álcool, diluídos 5000 vezes ou um extracto etanólico das uvas diluído 200 vezes, protegiam contra a oxidação. Uma diluição do vinho de modo a obter uma concentração de 10  $\mu\text{M}$  de polifenóis tinha o mesmo efeito protector que a quercetina na mesma concentração. Os compostos fenólicos vínicos eram mais eficientes que o tocoferol na redução da oxidação da LDL.

Outros autores<sup>74,75</sup> fizeram estudos semelhantes, obtendo resultados indicativos de que os compostos fenólicos que se encontram no vinho com diferentes níveis, são activos na protecção da LDL contra a oxidação, embora alguns sejam mais activos do que outros. As propriedades físicas e químicas de cada composto são, provavelmente, muito importantes para a explicação da sua actividade antioxidante e se a absorção de cada um deles for provada eles poderão contribuir para a prevenção

da oxidação *in vivo* da LDL<sup>8</sup>. Os níveis da cada polifenol depende, por sua vez, do tipo de solo, processos de vinificação, entre outros factores. Um exemplo destes factores advem de um estudo<sup>76</sup> em que se demonstrou que os processos de vinificação que incluem uma pré-incubação do mosto com as peles das uvas antes e durante a fermentação eram os mais eficientes na prevenção da oxidação da LDL *in vitro*, para os vinhos tintos e para alguns vinhos brancos.

Muitos estudos têm versado sobre os efeitos tóxicos agudos da ingestão de altas doses de fitoquímicos como os flavonoides e compostos fenólicos. No entanto, estes em concentrações baixas, como as existentes nas uvas e vinhos, poderão exercer vários efeitos benéficos como os que se resumiram na tabela 9.

Os flavonoides, como os do vinho, têm a capacidade de reagirem com aniões superóxido, hidróxilo e radicais peróxilo lípidicos. A grande variedade de compostos presentes no vinho e com potenciais redox diferentes poderá interagir sinergeticamente e assim dar, em concentrações baixas, efeitos protectores contra a oxidação lípidica e concebivelmente retardar as reacções patológicas que daí advem<sup>76</sup>.

As acções benéficas na retardação da aterogénese, segundo De Whalley<sup>77</sup>, devem-se à actuação dos flavonoides protegendo e talvez regenerando o tocoferol, por efeitos antioxidantes directos e pelo "scavenging" de radicais livres e radicais peróxilo.

#### IV.2.2.3. OS COMPOSTOS FENÓLICOS E A TROMBOSE

Os antioxidantes vegetais, como os do vinho, poderão também ser eficazes na redução da trombose e do bloqueamento de artérias, acontecimento este presente em mais de 90% das mortes por DCV. A agregação plaquetária é induzida pelo tromboxano, TXA<sub>2</sub> que se forma a partir da cascata do ácido araquidónico, sendo a síntese destes compostos promovida pelos hidroperóxidos lípidicos que se formam rapidamente em resposta a injúria de tecidos e também durante as reacções inflamatórias, na presença de macrófagos e plaquetas. Os antioxidantes inibem a peroxidação lípidica pela redução da concentração desses hidroperóxidos em geral, e por inibição das enzimas ciclooxigenase e a lipooxigenase da cascata do ácido araquidónico e assim reduzir a síntese do tromboxano e eicosanoides<sup>78</sup>.

## V. A POPULAÇÃO PORTUGUESA

A população portuguesa tem uma alimentação do tipo mediterrânico, na qual o vinho e o azeite têm considerável expressão. No entanto, ao longo dos últimos anos têm vindo a dar-se modificações com um incremento no consumo de lípidos totais, devido fundamentalmente a um maior consumo de óleos e gorduras (especialmente óleos vegetais e margarinas), de carne, de leite e seus derivados. Ao mesmo tempo verifica-se uma tendência para a diminuição do consumo de azeite. Sobre o consumo de bebidas alcoólicas e em especial de vinho, não foram encontrados dados<sup>79,80</sup>.

Embora o tipo de alimentação dos Portugueses possa levar a especular sobre a existência de fenómenos semelhantes ao Paradoxo Francês, a falta de dados sobre as taxas de mortalidade e as suas relações com os hábitos alimentares nacionais é grande. As doenças cardiovasculares permanecem a primeira grande causa de morte em Portugal correspondendo, em 1996, a 41,7% do total de óbitos e tem sido notório o peso cada vez mais significativo destas doenças na mortalidade<sup>81</sup>.

## VI. OBJECTIVOS DO TRABALHO

O presente trabalho pretende, em primeiro lugar, tentar estabelecer e/ou confirmar na população portuguesa, e recorrendo para tal a uma pequena amostragem da mesma, as diferenças entre os vários marcadores lípidicos relacionáveis com o consumo de bebidas alcoólicas, e se possível, com o consumo de vinho em particular, dado esta bebida ter uma produção e consumo preferencial em Portugal.

Em segundo lugar, este trabalho pretende obter dados sobre a relação entre consumo de bebidas alcoólicas e aumento do poder antioxidante sérico e quais os elementos intervenientes nesse aumento, isto é, se há aumento dos níveis das defesas antioxidantes endógenas enzimáticas e não enzimáticas.

*MATERIAL E MÉTODOS*

## I.1. AMOSTRAGEM

Os participantes neste trabalho foram todos voluntários e a todos foram explicados os objectivos gerais do trabalho e obtido o seu consentimento.

Todos os participantes preencheram um inquérito sobre os seus hábitos alimentares, consumo de tabaco, consumo de bebidas alcoólicas, medicação, actividade profissional e actividade física voluntária, história clínica (com principal incidência nas doenças cardiovasculares) e história clínica familiar. Inclui-se um exemplar do formulário do inquérito, em anexo, no fim desta secção.

O único critério de exclusão de participantes utilizado foi a presença de níveis séricos elevados na enzima  $\gamma$ -glutamyltransferase, que é indicadora de função hepática alterada.

## I.2. COLHEITAS DE SANGUE

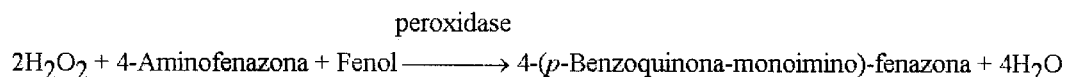
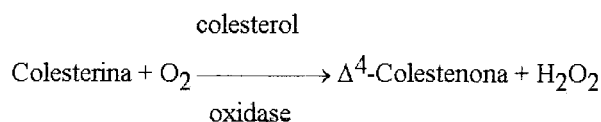
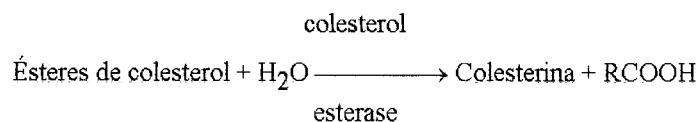
As colheitas das amostras de sangue de todos os participantes foram efectuadas por venipunctura e recolhendo-se, por indivíduo, dois tubos de sangue sem anticoagulante, um tubo com  $K_3EDTA$  e um tubo com heparina-lítio como anticoagulantes.

Os tubos de soro foram centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos sendo o soro separado e aliquotado. As alíquotas não necessárias para o trabalho diário foram congeladas a  $-20^{\circ}C$ .

Os tubos de sangue com EDTA, após retirada de uma alíquota, foram centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos e nunca excedendo os 60 minutos após a colheita. O plasma (designado a partir deste ponto como plasma EDTA) assim obtido foi aliquotado sendo as alíquotas não utilizadas, congeladas a  $-20^{\circ}C$ . O *pellet* de eritrócitos foi lavado com cloreto de sódio 0.9% e hemolisado com 3 volumes de água bidestilada fria. O lisado obtido foi utilizado no procedimento I.12. As alíquotas não utilizadas no dia foram congeladas a  $-70^{\circ}C$ .

## I.3. DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL TOTAL

A determinação da concentração sérica do colesterol total foi efectuada recorrendo a um kit comercial (Cholesterol, Boehringer Mannheim, ref. n° 1442350), baseado no método colorimétrico enzimático CHOD-PAP da Boehringer Mannheim, que se apresenta de seguida:



As determinações foram efectuadas em alíquotas de soro fresco.

As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 500nm. Para todas as leituras deste trabalho foi utilizado um espectrofotómetro Shimadzu UV-265.

#### I.4. DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL HDL

A determinação da concentração sérica do colesterol HDL foi efectuada recorrendo a um precipitante de compra (HDL-C, Boehringer Mannheim, ref. nº543004). Neste método, as quilomicras, VLDL e LDL são precipitadas pela adição de ácido fosfotúngstico e iões de magnésio à amostra. A centrifugação deixa apenas HDL no sobrenadante sendo o seu conteúdo em colesterol determinado em seguida, pelo método CHOD-PAP descrito no ponto I.3.

As determinações foram efectuadas em alíquotas de soro fresco.

#### I.5. DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL LDL

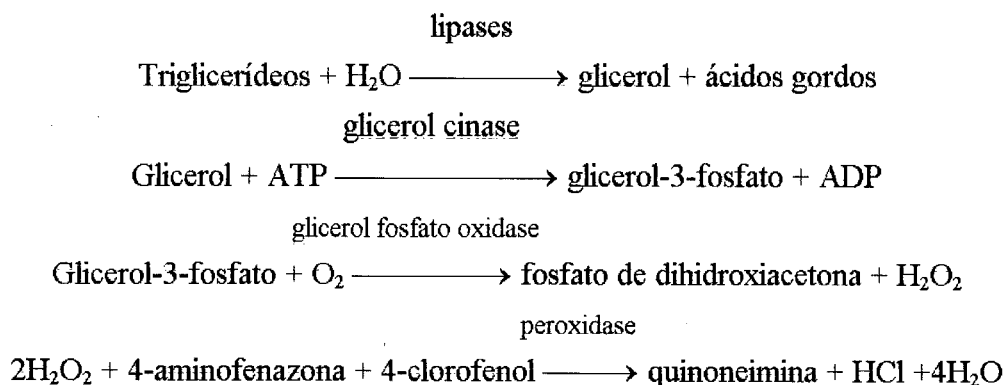
A determinação da concentração sérica do colesterol LDL foi efectuada recorrendo a um kit comercial (LDL-C, Boehringer Mannheim, ref. nº726290) baseado no método da precipitação pelo sulfato de polivinilo. Neste método as LDL são precipitadas pela adição de sulfato de polivinilo à amostra e a sua concentração é calculada a partir da diferença entre o colesterol total dessa amostra e o colesterol no sobrenadante, após centrifugação, ambos determinados pelo método Colesterol-PAP, descrito no ponto I.3.

As determinações foram efectuadas em alíquotas de soro fresco.



## I.6. DETERMINAÇÃO DOS TRIGLICERÍDEOS

A determinação da concentração sérica dos triglicerídeos foi executada recorrendo a um kit comercial (TG Unimate 7, Roche, ref. nº0736805). As determinações são efectuadas pelo método GPO-PAP, um teste enzimático colorimétrico, pelo qual a concentração sérica dos triglicerídeos é determinada após hidrólise enzimática por lipases. Pela acção catalítica de uma peroxidase, forma-se um composto corado, a quinoneimina:



As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 500nm, num autoanalisador COBAS MIRA. As determinações foram efectuadas em alíquotas de soro fresco ou alíquotas de soro congelado a -20°C.

## I.7. DETERMINAÇÃO DA APOLIPOPROTEÍNA A-I

A determinação da concentração sérica da apolipoproteína A-I foi efectuada por imunoturbidimetria recorrendo a um kit comercial (apo AI, Boehringer Mannheim, ref. nº 1174380), usando anticorpos específicos. A reacção imune na qual se forma um complexo anticorpo-antigénio causa uma turbidez que aumenta ao longo do tempo. A densidade óptica medida a 340 nm é directamente proporcional à concentração de apolipoproteína na amostra. Esta determinação foi efectuada num autoanalisador COBAS MIRA. As determinações foram efectuadas em alíquotas de soro fresco ou alíquotas de soro congelado a -20°C.

## I.8. DETERMINAÇÃO DA APOLIPOPROTEÍNA B

A determinação da concentração sérica da apolipoproteína B foi efectuada por imunoturbidimetria recorrendo a um kit comercial (Apo B, Boehringer Mannheim, ref. nº1173481), usando anticorpos específicos. A reacção imune na qual se forma um complexo anticorpo-antigénio causa uma turbidez que aumenta ao longo do tempo. A

densidade óptica medida a 340 nm é directamente proporcional à concentração de apolipoproteína na amostra. Esta determinação foi efectuada num autoanalisador COBAS MIRA. As determinações foram efectuadas em alíquotas de soro fresco ou alíquotas de soro congelado a -20°C.

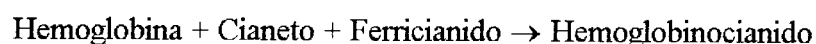
#### I.9. DETERMINAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA(a)

A determinação da concentração sérica da Lp(a) foi efectuada recorrendo a um kit comercial (Hydragel Lp(a), Sebia), segundo uma técnica de electroimunoprecipitação em gel de agarose, no qual um anticorpo anti apo(a) monoespecífico se encontra incorporado. As concentrações das amostras são determinadas por leitura da altura dos picos de precipitação dessas amostras e subsequente interpolação na curva de calibração obtida pela representação gráfica das alturas de picos *versus* concentrações dos calibradores fornecidos no kit.

As determinações foram efectuadas em alíquotas de soro fresco ou alíquotas de soro congelado a -20°C.

#### I.10. DETERMINAÇÃO DA HEMOGLOBINA

A determinação da concentração da hemoglobina foi efectuada em sangue total colhido em tubos com K<sub>3</sub>EDTA como anticoagulante e utilizando um kit comercial (Hb, Boehringer Mannheim, ref. n° 124729), baseado no método de hemoglobincianido, segundo a seguinte reacção química:



As leituras foram efectuadas a 546nm, em alíquotas frescas.

#### I.11. DETERMINAÇÃO DO *STATUS* ANTIOXIDANTE TOTAL

A determinação da concentração sérica de status antioxidante total foi efectuada usando um kit comercial (Total Antioxidant Status; Randox Labs., ref. n° NX2332). Neste método o ABTS<sup>®</sup> (2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolino sulfonato]) é incubado com uma peroxidase (metmioglobina) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para produzir um catião ABTS<sup>®.+</sup>. Este catião tem uma cor verde-azulada, relativamente estável a 600nm. Os antioxidantes

presentes na amostra utilizada causam uma supressão na produção de cor num grau proporcional à sua concentração.

Estas determinações foram efectuadas, sempre que possível, em soro fresco (também se pode utilizar plasma heparinizado). Na outras situações recorreu-se a soro congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , dado as amostras se manterem estáveis a esta temperatura durante 14 dias.

#### **I.12. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE**

A determinação da actividade eritrocitária da enzima superóxido dismutase (CuZnSOD) foi efectuada usando um kit comercial (RANSOD; Randox Labs., ref. nº SD125), baseado no método desenvolvido por McCord e Fridovich, acoplado um gerador de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  com um detector de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Neste kit, a xantina e a xantina oxidase são utilizadas para gerar  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio (INT), que reage com o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  com formação de um corante vermelho, o formazan, que é usado como detector. A CuZnSOD inibe a formação do formazan e a sua actividade é medida como a percentagem de inibição comparada com uma curva de calibração obtida com SOD purificada. Por fim, a concentração da enzima é expressa por grama de hemoglobina.

As determinações foram feitas em alíquotas de eritrócitos hemolisados, conforme descrito no ponto I.2. Sempre que possível utilizaram-se alíquotas frescas (obtidas a partir de sangue colhido em  $\text{K}_3\text{EDTA}$ , embora também se possa utilizar heparina). Em outras situações foram utilizadas alíquotas congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Previamente, verificou-se que não se obtinham diferenças significativas entre os resultados de alíquotas frescas e alíquotas congeladas.

#### **I.13. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE**

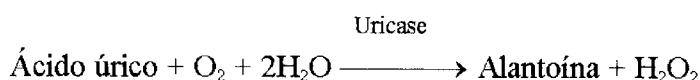
A determinação da concentração sérica da enzima glutatona peroxidase (GPX) foi efectuada utilizando um kit comercial (Bioxytech® pl-GPx Enzyme Immunoassay, OXIS International, Inc., ref. nº 21014). Neste kit a determinação da GPX é efectuada por ELISA, no qual as amostras são incubadas numa microplaca, cujos poços são revestidos com anticorpos policlonais biotinilados, específicos para a GPX humana. A presença de GPX é detectada através de uma amplificação, via acoplamento de uma estreptavidina ligada covalentemente a uma fosfatase alcalina, à biotina. A

concentração de GPX é medida enzimaticamente após a adição de nitrofenil-fosfato (pNPP) e leitura a 405 nm.

Estas determinações foram efectuadas em alíquotas de soro fresco ou congeladas a -20°C.

#### I.14. DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO ÚRICO

A determinação da concentração sérica do ácido úrico foi efectuada recorrendo a um kit comercial (Unimate 7 UA, Roche, Ref. nº0736821). As determinações são efectuadas pelo método da Uricase/PAP, um teste enzimático colorimétrico, baseado no seguinte princípio:



Na presença de uma peroxidase, o peróxido de hidrogénio formado provoca o acoplamento oxidativo do ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfónico (DHBS) e da 4-aminoantipirina (PAP) para formar um composto vermelho. A intensidade da cor é directamente proporcional à concentração de ácido úrico e é medida espectrofotometricamente a 520 nm. As determinações foram executadas num autoanalisador COBAS MIRA e em alíquotas de soro fresco ou alíquotas de soro congelado a -20°C.

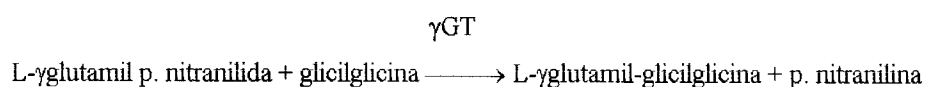
#### I.15. DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A determinação dos níveis plasmáticos de peroxidação lipídica foi efectuada utilizando um kit comercial (LPO-586, Colorimetric Assay for Lipid Peroxidation, Wak Chemie, ref. nº 21012). A peroxidação lipídica leva à destruição das membranas celulares e produção de peróxidos lipídicos e outras substâncias como aldeídos. O malonaldeído (MDA) e os 4-hidroxiacetonais, como o 4-hidroxi-2(E)-nonenal (4-HNE), são moléculas derivadas da quebra de ácidos gordos poliinsaturados e respectivos ésteres. A quantificação de tais aldeídos fornece um index da peroxidação lipídica. Este kit baseia-se na reacção de um cromogénio com o MDA e os 4-hidroxiacetonais a 45°C. Uma molécula de MDA ou de 4-hidroxiacetonal reage com duas moléculas de cromogénio para dar um cromóforo com absorvância máxima a 586 nm. Este método pode ser utilizado para determinar o MDA + 4-hidroxiacetonais ou só MDA, sem interferência dos 4-hidroxiacetonais, em soluções aquosas.

Estas determinações foram efectuadas em plasma EDTA e nunca após um período superior a 60 minutos após a colheita.

#### I.16. DETERMINAÇÃO DA $\gamma$ GT

A determinação da concentração sérica da enzima  $\gamma$ -glutamyltransferase foi efectuada recorrendo a um kit comercial (Enzyline  $\gamma$ GT 20S, bioMérieux, ref. nº 63712). Neste método cinético, a actividade da  $\gamma$ GT é determinada de acordo com a seguinte reacção:



As determinações, a 405 nm, foram efectuadas num autoanalisador COBAS MIRA e em alíquotas de soro fresco ou alíquotas de soro congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### I.17. CONTROLO DE QUALIDADE

Em todas as séries de trabalho e para todas as análises executadas, foram analisadas amostras de controlos, nas mesmas condições que as amostras clínicas, para validação dos resultados.

#### I.18. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas apresentadas foram efectuadas utilizando os programas informáticos Excel 97 da Microsoft e Statview™, versão 4,5 da Abacus.

*ANEXO*

**Influência do meio ambiente  
no desenvolvimento de doença cardiovascular**

Inquérito nº \_\_\_\_\_ 1ª Colheita \_\_\_\_\_ 2ª Colheita \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_

Telefone \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ anos Sexo \_\_\_\_\_

Pressão sanguínea sistólica \_\_\_\_\_ diastólica \_\_\_\_\_

Altura (metros) \_\_\_\_\_ Peso (Kg) \_\_\_\_\_

Medida da cintura (cm) \_\_\_\_\_ Medida de anca (cm) \_\_\_\_\_

Toma alguns medicamentos (incluindo contraceptivos orais ou terapia de substituição)?

Nome dos medicamentos: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinale com círculo: Fumador Habitual Ex-Fumador Não Fumador

No caso de ser fumador:

Quantos cigarros fuma por dia? \_\_\_\_\_ Há quantos anos fuma \_\_\_\_\_

No caso de ser ex-fumador: Há quantos anos deixou de fumar \_\_\_\_\_

Quantas chavenas de café toma por dia? \_\_\_\_\_

Quantas peças de fruta come diariamente? \_\_\_\_\_

Quantas vezes por semana come hortaliça cozida? \_\_\_\_\_

Quantas vezes por semana come vegetais crus? \_\_\_\_\_

Quantas vezes por semana come peixe? \_\_\_\_\_

Quantas vezes por semana come carne \_\_\_\_\_

Consome normalmente manteiga ou margarina \_\_\_\_\_

Quantas vezes por semana consome azeite \_\_\_\_\_

Os seus alimentos são cozinhados com azeite ou óleo \_\_\_\_\_

Toma bebidas alcoólicas?

No caso de resposta afirmativa, toma habitualmente:

Cerveja \_\_\_\_\_ unidades, vinho tinto \_\_\_\_\_ unidades,

vinho branco \_\_\_\_\_ unidades, bebidas espirituosas \_\_\_\_\_ unidades

Unidades por semana \_\_\_\_\_

Nota: 1 unidade= uma cerveja

= um copo de vinho

= um cálice de bebida espirituosa

Qual a sua actividade profissional? \_\_\_\_\_

O seu trabalho envolve exercício físico?

Qual a sua actividade física fora do trabalho:

Inactiva (passeia menos de 20 minutos por dia) \_\_\_\_\_

Activa (passeia mais de 20 minutos por dia) \_\_\_\_\_

Muito activa (exercício físico voluntário); nº vezes por semana \_\_\_\_\_

Algum membro da sua família teve alguma das seguintes manifestações clínicas?

Pressão sanguínea elevada \_\_\_\_\_ Angina de peito \_\_\_\_\_

Ataque cardíaco não fatal \_\_\_\_\_ Ataque cardíaco fatal \_\_\_\_\_

Outra doença grave ( especifique qual ) \_\_\_\_\_

**Nota:** no caso de resposta afirmativa indique a idade em que apareceu a sintomatologia, assim como o grau de parentesco.



## *RESULTADOS E DISCUSSÃO*

## I. RESULTADOS

### I.1. AMOSTRAGEM

Este trabalho foi realizado sobre uma amostragem da população portuguesa, constituída por 80 indivíduos dos quais 18 foram excluídos por apresentarem função hepática alterada, avaliação esta feita através de valores elevados de  $\gamma$ GT. Restaram 62 indivíduos, 39 mulheres e 23 homens, com idades compreendidas entre os 21 e os 64 anos. Todos estes participantes voluntários preencheram um inquérito sobre os seus hábitos alimentares, consumo de tabaco e de bebidas alcoólicas, actividade física e história pessoal e familiar de doenças cardiovasculares. Não foi utilizado nenhum outro critério de exclusão.

Mediante a avaliação do consumo de bebidas alcoólicas, os participantes foram divididos em dois grupos - consumidores e não consumidores - com as características indicadas na tabela 1.

Consideraram-se consumidores todos os indivíduos que indicaram um consumo igual ou superior a quatro bebidas por semana. Para o estabelecimento deste limite de separação entre consumidores e não consumidores, foi tido em conta o facto da maior parte dos participantes com consumo inferior a quatro bebidas por semana, indicarem um consumo de apenas uma ou duas bebidas e, em muitos casos, com um carácter bastante irregular. Devido ao pequeno número de participantes não foram estabelecidas categorias de consumo.

Tabela 1 - Distribuição dos participantes pelas duas categorias de consumo estabelecidas.

	Total	Mulheres	Homens	Idades	Fumadores
Não consumidores	31	25	6	24-62	7 (23%)
Consumidores	31	14	17	21-64	12 (39%)

Em relação ao tipo de bebidas consumidas não foi feita qualquer distinção, até porque vários indivíduos consomem mais do que um tipo de bebida. Tornou-se, no entanto, evidente uma preferência pelo vinho tinto (quase todos os consumidores o assinalaram), seguido pelo vinho branco e cerveja e, em último lugar, pelas bebidas espirituosas.

Em relação aos hábitos alimentares e de exercício físico dos participantes, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os consumidores e não consumidores, nem entre homens e mulheres. Salienta-se, no entanto, que os consumidores de bebidas alcoólicas apresentam um consumo superior de café e de carne e os não consumidores preferem peixe e comem mais frutas e vegetais. Os homens, independentemente da ingestão de bebidas alcoólicas, são os principais consumidores de carne e de café. Os não consumidores e as mulheres são o que praticam mais exercício físico voluntário. Não se apresentam os dados referentes às gorduras (azeite, óleos, margarinas e manteiga) porque a inconsistência da maioria das respostas não permitiu a sua quantificação, embora pareça haver uma utilização preferencial de azeite por parte dos não consumidores.

Todos estes dados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – As diferenças das preferências alimentares entre consumidores e não consumidores e entre homens e mulheres. Apresentam-se os valores médios e respectivos desvios padrão excepto para o exercício físico que está expresso como percentagem do total de cada grupo.

ALIMENTO	Consumidores	Não consumidores	Homens	Mulheres
Café/dia	2,4±1,6	1,9±1,4	2,4±1,4	2,0±1,4
Fruta/dia	2,4±1,8	3,0±1,4	2,4±1,4	2,5±1,8
Hortaliça cozida/semana	4,7±3,1	4,3±3,2	3,0±2,0	5,5±3,4
Vegetais crus/semana	3,6±3,1	4,0±2,4	3,6±2,8	3,8±2,8
Peixe/semana	4,0±2,0	4,4±2,5	4,3±1,8	5,5±2,5
Carne/semana	7,4±2,4	6,6±2,5	9,7±1,8	8,5±2,5
Exercício físico	63%	74%	56%	72%

## 1.2. MARCADORES LÍPIDICOS

A todos os participantes foi pedido que mantivessem um jejum de cerca de 12 horas após o qual lhes foi retirada uma amostra de sangue, por venipunctura e tendo sido efectuadas as seguintes determinações lípidicas:

- Colesterol total (mg/dl)
- Colesterol HDL (mg/dl)
- Colesterol LDL (mg/dl)
- Lipoproteína (a) (g/l)
- Triglicérideos (mg/dl)
- Apolipoproteína AI (mg/dl)
- Apolipoproteína B (mg/dl)

Obtiveram-se os seguintes resultados, para os dois grupos (Tabela 3):

Tabela 3 – Valores médios expressos em mg/dl (excepto para a Lp(a), que é expressa em g/l) e respectivos desvios padrão e coeficientes de variação (CV) dos analitos lipídicos determinados nos dois grupos. (COL.T=colesterol total; TG=triglicéridos).

GRUPO	COL.T	HDL	LDL	Lp(a)	TG	ApoAI	ApoB
Não consumidores	204±40	48±12	140±41	0,30±0,21	121±56	153±36	121±45
CV (%)	20	20	29	70	46	23	37
Consumidores	207±47	58±15	139±51	0,24±0,20	112±58	171±28	111±33
CV (%)	23	26	37	83	52	16	30

A aplicação do teste *t* de Student aos resultados obtidos, para determinar se existem ou não diferenças estatísticas significativas entre as médias, levou aos valores representados na tabela 4.

Tabela 4 – Análise estatística dos resultados dos marcadores lipídicos, expressa pelos valores de *t* ( $P < 0,05$ ).

	COL.T	HDL	LDL	Lp(a)	TG	ApoAI	ApoB
Valor de <i>t</i>	0,634	2,200	0,086	0,960	0,561	2,554	0,883

O valor teórico de *t* para o grau de liberdade deste estudo ( $v = n_1 + n_2 - 2 = 59$ ) é de 2,0017, donde se conclui que os únicos valores significativamente diferentes são as médias do colesterol HDL e da apolipoproteína A-I ( $t > 2$ ). Estes valores médios são mais altos para os consumidores.

Para a Lp(a) existe uma grande dispersão de valores, expressa por desvios padrões e coeficientes de variação elevados (70 e 83%), o que dificulta a interpretação dos resultados entre os dois grupos.

### I.3. ANTIOXIDANTES

Para todos os participantes foram determinados os níveis séricos ou plasmáticos dos seguintes antioxidantes:

*Status* antioxidante total (mmol/l)

Superóxido dismutase (U/g Hb)

Glutathiona peroxidase (ng/ml)

Ácido úrico (mg/dl)

Obtiveram-se os resultados representados na tabela 5, para os dois grupos.

Tabela 5 – Valores médios e respectivos desvios padrão e coeficientes de variação dos vários antioxidantes determinados para os dois grupos. (SOD=superóxido dismutase; GPX=glutathiona peroxidase).

GRUPO	<i>STATUS</i>	SOD	GPX	ÁCIDO ÚRICO
Não consumidores	1,09±0,35	928±499	90±64	5,4±1,6
CV (%)	32	54	71	30
Consumidores	1,28±0,20	1032±364	135±146	6,1±1,5
CV (%)	16	35	108	25

A aplicação do teste *t* de Student aos resultados obtidos, para determinar se existem ou não diferenças estatísticas significativas entre os valores das médias, levou aos valores representados na tabela 6.

Tabela 6 – Análise estatística dos antioxidantes, expressa pelos valores de *t* ( $P < 0,05$ ).

	<i>STATUS</i>	SOD	GPX	Ác. Úrico
Valor de <i>t</i>	2,497	0,874	1,524	2,196

Para  $v=59$ ,  $t=2,0017$ , donde se conclui só haver diferenças significativas para os valores de *status* antioxidante total e ácido úrico, com valores superiores para a categoria dos consumidores.

Para as enzimas SOD e GPX a grande amplitude de valores encontrados (expressa pelos elevados valores dos desvios padrões) não permite, talvez devido ao número reduzido de amostras, tirar conclusões, embora seja de realçar que os valores da média determinados são sempre superiores para os consumidores.

#### 1.4. PEROXIDAÇÃO LÍPIDICA

A avaliação do nível de peroxidação lípidica foi feita através da determinação dos níveis plasmáticos de malonaldeído (MDA) e 4-hidroxicenais, mais concretamente, o 4-hidroxi-2(E)-nonenal (4-HNE).

Obtiveram-se os seguintes resultados (tabela 7):

Tabela 7 – Valores médios expressos em  $\mu\text{M}$  e respectivos desvios padrão e coeficientes de variação obtidos para os marcadores de peroxidação lípidica.

GRUPO	MDA+4-HNE	MDA
Não consumidores	17,8 $\pm$ 4,7	10,7 $\pm$ 3,7
CV (%)	26	35
Consumidores	21,6 $\pm$ 6,3	11,2 $\pm$ 4,2
CV (%)	29	38

A aplicação do teste *t* de Student aos resultados obtidos, para determinar se existem ou não diferenças estatísticas significativas entre os valores das médias, levou aos valores representados na tabela 8.

Tabela 8 – Análise estatística dos marcadores de peroxidação lípidica, expressa pelos valores de *t* ( $P < 0,05$ ).

	MDA +4-HNE	MDA
Valor de <i>t</i>	2,416	0,283

Para  $v=59$ ,  $t=2,0017$ , donde se conclui só haver diferenças significativas para o valor de MDA+4-HNE, com valor médio superior para a categoria dos consumidores.

## I.5. EFEITO DA MUDANÇA DE CONSUMO

Para tentar avaliar as modificações causadas pela alteração dos padrões de consumo, foram efectuadas duas experiências, recorrendo a participantes sem história pessoal de doenças cardiovasculares. Para tal, pediu-se a todos esses participantes que mudassem os seus hábitos de ingestão de bebidas alcoólicas. Dos 62 participantes, apenas dois não consumidores passaram a consumir um copo de vinho tinto, todos os dias, durante quatro semanas e apenas dois consumidores reduziram o seu consumo em cerca de 50% e de uma forma sistemática, durante o mesmo período de tempo. O número tão reduzido de voluntários cuja alteração de hábitos oferecia confiança, não permitiu extrair resultados conclusivos, razão pela qual não se apresentam os resultados.

## I.6. A INFLUÊNCIA DA IDADE E DO SEXO NOS DIFERENTES MARCADORES

Separaram-se os participantes por sexo e por idade (superior ou inferior a 45 anos) para ver se existem diferenças importantes segundo esta divisão. Escolheu-se os 45 anos como “linha de separação”, pois uma idade igual ou superior a 45 anos é factor de risco de DCV para os homens e para as mulheres começam a aumentar as probabilidades de menopausa. Os resultados apresentam-se na tabela 9.

Apesar dos números diferentes de participantes que caem em cada categoria, salientam-se alguns resultados com significado estatístico:

Os níveis de colesterol total são superiores no grupo dos homens com mais de 45 anos.

Os níveis de LDL são superiores para as mulheres com mais de 45 anos.

Os homens têm valores mais elevados de triglicéridos e de ácido úrico, independentemente da idade.

Os valores de MDA dos homens com menos de 45 anos são superiores aos das mulheres da mesma faixa etária.

Qualquer uma destes resultados necessita confirmação numa amostragem maior e mais uniforme quanto ao número de participantes por categoria.

Tabela 9 – Valores médios e respectivos desvios padrões dos diferentes analitos estudados e após divisão dos participantes segundo a idade e o sexo.

	< 45 ANOS		≥45 ANOS	
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
Nº amostras	17	25	6	14
Colesterol total	198±46	191±34	231±54	229±37
HDL	49±16	53±12	51±12	57±16
LDL	135±52	126±37	165±54	157±46
Lp(a)	0,28±0,23	0,25±0,20	0,31±0,21	0,29±0,21
TG	132±73	92±25	162±23	122±68
ApoA-I	152±20	165±38	158±31	171±38
ApoB	109±39	109±45	140±29	126±31
Status	1,24±0,38	1,16±0,26	1,20±0,23	1,16±0,28
SOD	1117±508	946±411	984±310	871±432
GPX	129±172	108±86	70±71	118±87
Ác. Úrico	7,2±0,7	5,0±1,2	7,1±1,3	4,6±1,2
MDA	11,8±3,2	9,8±3,8	11,6±6,2	11,9±3,5
MDA+4HNE	20,4±7,3	18,8±5,2	21,2±5,7	20,0±5,4



## II. DISCUSSÃO

### II.1. AMOSTRAGEM

Em relação à amostragem populacional utilizada neste estudo é de referir alguns aspectos. Existem mais mulheres na categoria dos não consumidores do que dos consumidores e esta última categoria apresenta também a maior percentagem de fumadores. Este tipo de constatação é passível de ser encontrada em quase todos os estudos deste género que foram consultados para a execução deste trabalho<sup>31,39</sup>.

Os não consumidores apresentam uma tendência para um estilo de vida mais saudável com um consumo preferencial de peixe e de produtos de origem vegetal e uma maior proporção indivíduos a praticar exercício físico voluntário. O mesmo se verifica para as mulheres em relação aos homens. Atendendo a que o grupo dos não consumidores é composto maioritariamente por mulheres, parece ser uma constatação lógica.

Convém referir, que seria preferível ter sido utilizado um número igual de homens e mulheres em cada categoria de consumo, o que não foi possível.

### II.2. MARCADORES LÍPIDICOS

Os perfis lípidicos obtidos estão igualmente de acordo com toda a literatura consultada. O consumo de bebidas alcoólicas aumenta os níveis de HDL e de apoAI<sup>28,29,39</sup>. Não se verificaram alterações significativas nos níveis de LDL e de triglicérides, talvez porque não participaram indivíduos com consumos muito elevados (os três consumidores mais fortes indicaram consumos de 41, 42 e 50 bebidas por semana).

A representação gráfica do consumo vs HDL (figura 1), levou à obtenção de uma recta de regressão com declive positivo e um factor de correlação,  $r=0,317$ , dando uma indicação de aumento dos níveis da lipoproteína com o aumento do consumo. Os níveis de HDL e apoAI também se correlacionam positivamente (fig. 2).

Embora não haja diferenças estatísticas significativas entre os valores de triglicérides, para os dois grupos, a representação gráfica da relação entre consumo e triglicérides (figura 3), levou à obtenção de uma recta de regressão com declive positivo. Alguns autores<sup>82,83</sup> referem uma associação fraca entre estes dois parâmetros, que desaparece muitas vezes após ajuste para o consumo de tabaco. Neste trabalho não houve a possibilidade de efectuar esse tipo de compensação.

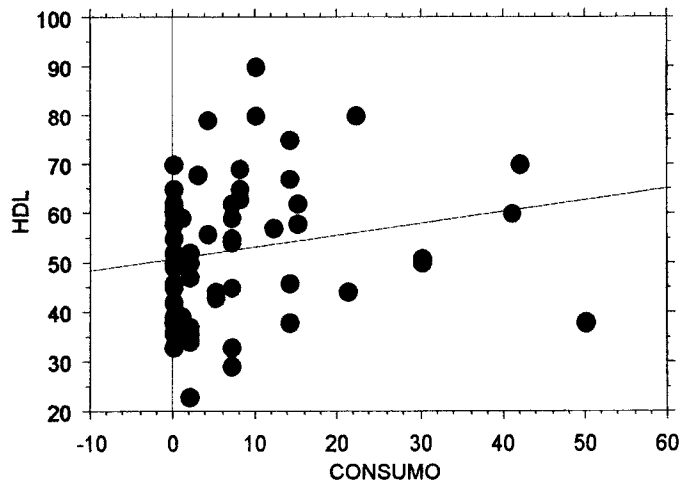


Figura 1 – Representação gráfica da correlação entre consumo de bebidas alcoólicas e concentração sérica de HDL (consumo expresso em nº bebidas/semana e HDL em mg/dl).

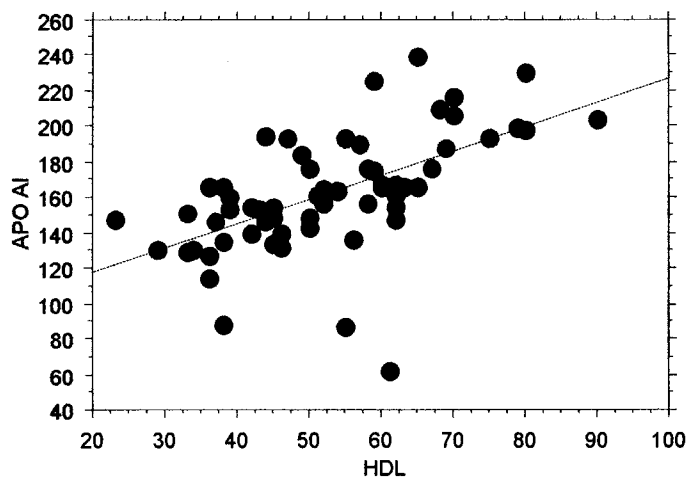
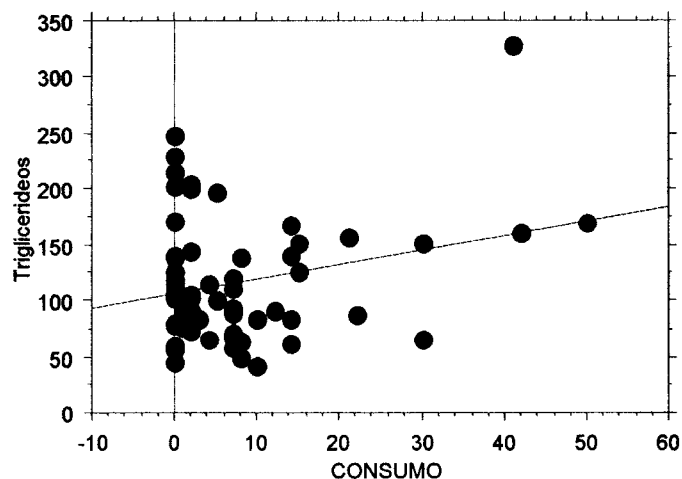


Figura 2 - Representação gráfica da correlação entre as concentrações séricas de HDL e de apoAI (concentrações expressas em mg/dl).



### II.3. ANTIOXIDANTES

Os consumidores apresentam um valor de *status* antioxidante total mais elevado do que os não consumidores, o que está de acordo com alguns trabalhos<sup>73</sup>. A comparação entre consumo e *status* antioxidante total levou à obtenção de uma recta de regressão com declive positivo e um coeficiente de correlação de 0,366 (figura 4).

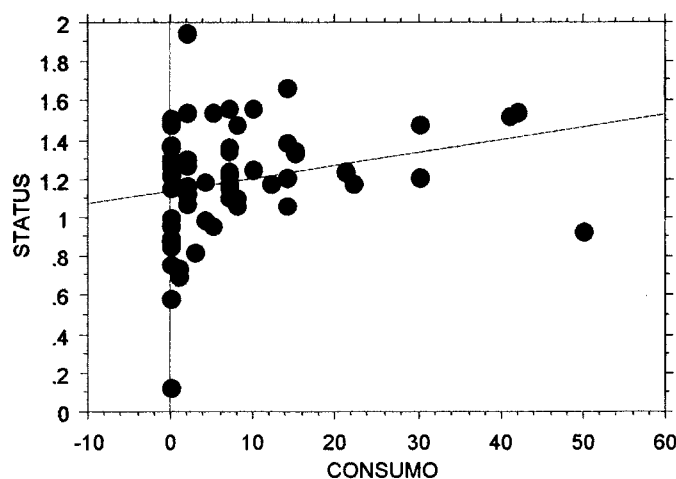


Figura 4 - Representação gráfica da correlação entre consumo de bebidas alcoólicas e concentração de *status* antioxidante total (consumo de bebidas alcoólicas expresso em nº de bebidas/semana e *status* em mmol/l).

Neste trabalho tentou-se descobrir quais os possíveis contribuintes para esse aumento de capacidade antioxidante do soro humano.

Um dos analitos para o qual se obteve uma diferença estatística significativa entre os dois grupos foi o ácido úrico, com valores mais altos para os consumidores. Como foi referido na Introdução, o ácido úrico é um antioxidante presente no plasma humano em quantidade relativamente elevada, contribuindo em cerca de 35-65% para a capacidade total sérica de scavenging de radicais peróxido e é importante na protecção do ácido ascórbico contra a oxidação<sup>48</sup>. Para além disso, alguns autores<sup>86</sup> referiram alterações na concentração sérica de ácido úrico, após a ingestão de vinho do Porto. Meia hora após a ingestão foi observado um aumento de 23% da concentração de ácido úrico e um aumento de 24% da capacidade antioxidante total

sérica, começando a declinar após cerca de 2.4 horas. Os investigadores concluem dizendo que os dados sugerem que aproximadamente 73% do aumento, de fase aguda, da capacidade antioxidante total, após ingestão de vinho de Porto, pode ser atribuída ao aumento da concentração sérica de ácido úrico. O ácido úrico é um produto final do metabolismo das purinas, nos humanos. Assim sendo, o efeito agudo observado depois da ingestão do vinho do Porto poderá ser devido, quer à estimulação da produção de ácido úrico por aumento da taxa de quebra das purinas, quer por inibição da excreção urinária de ácido úrico.

Neste estudo, a recta de regressão entre consumo de bebidas alcoólicas e ácido úrico levou à obtenção de uma recta com declive positivo e um factor de correlação de 0,301 (figura 5). O mesmo tipo de comparação entre valores de *status* antioxidante total e ácido úrico levou a uma correlação positiva (figura 6) mas bastante mais fraca ( $r=0,205$ ). Convém referir que neste trabalho não foi testado o efeito agudo da ingestão de bebidas alcoólicas, que é a situação descrita por Day<sup>86</sup> e não foi possível encontrar qualquer trabalho na literatura consultada, descrevendo quer o efeito de outro tipo de bebidas, quer o efeito a longo prazo da ingestão de qualquer bebida alcoólica na concentração de ácido úrico.

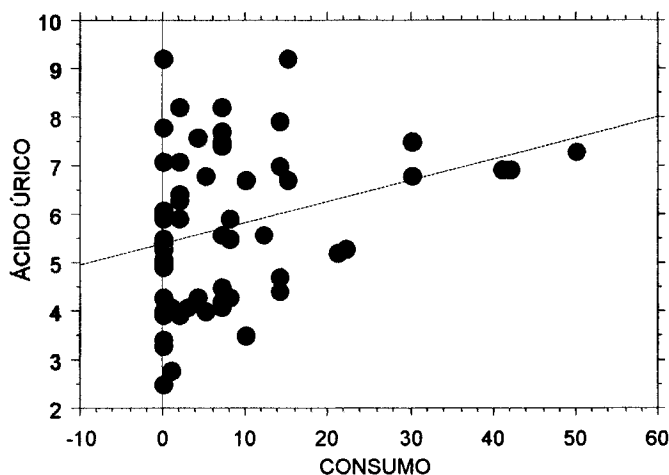


Figura 5 - Representação gráfica da correlação entre consumo de bebidas alcoólicas e concentração sérica de ácido úrico (consumo expresso em nº bebidas/semana e ácido úrico em mg/dl).

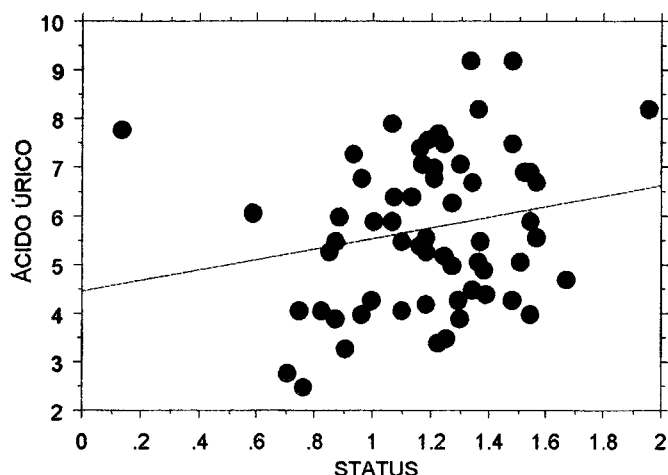


Figura 6 - Representação gráfica da correlação entre as concentrações séricas de *status* antioxidante total e ácido úrico (*status* expresso em mmol/l e ácido úrico em mg/dl).

Em relação à actividade da enzima superóxido dismutase nos eritrócitos não se obtiveram diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos embora a média nos consumidores seja superior. De referir, também, a grande amplitude de valores obtidos.

Neste estudo foi possível obter uma correlação positiva entre *status* antioxidante total e SOD com um  $r$  de 0,247 (figura 7) e uma correlação positiva mais fraca,  $r=0,120$ , entre SOD e consumo de bebidas alcoólicas (figura 8).

Em relação à concentração sérica da enzima glutathiona peroxidase também não se obtiveram diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos, embora a média nos consumidores seja mais alta. Verificou-se, como para a SOD, uma grande amplitude de valores.

As correlações entre GPX e consumo e entre GPX e *status* antioxidante total são ambas positivas mas bastante fracas,  $r=0,158$  e  $r=0,112$ , respectivamente.

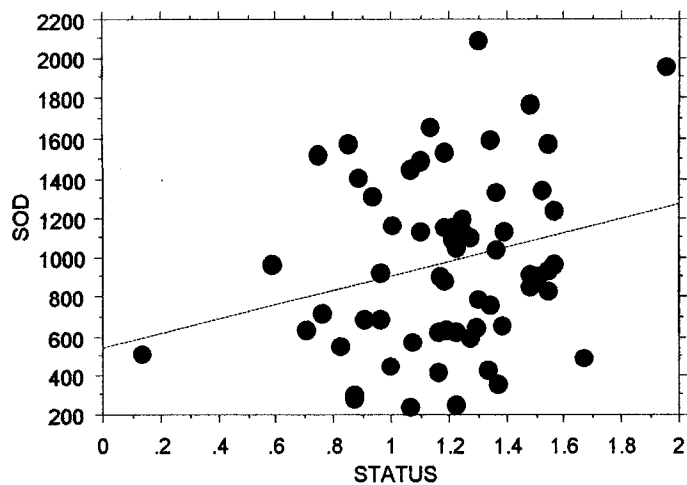


Figura 7 - Representação gráfica da correlação entre concentração sérica de *status* antioxidante total e concentração eritrocitária de SOD (*status* expresso em mmol/l e SOD em U/g Hb).

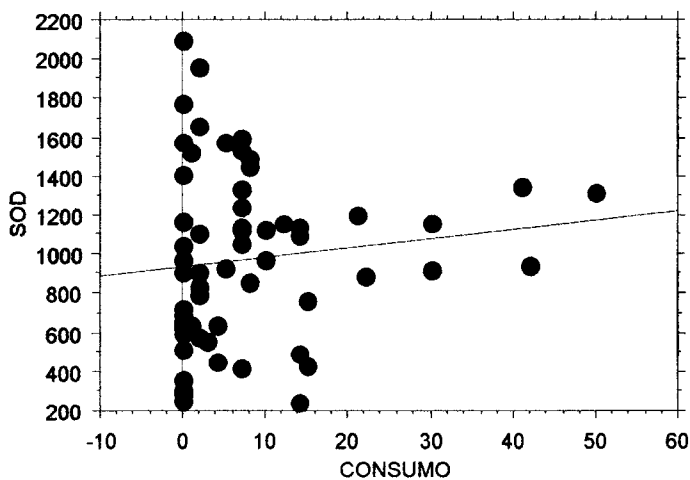


Figura 8 - Representação gráfica da correlação entre consumo de bebidas alcoólicas e concentração eritrocitária de SOD (consumo expresso em nº bebidas/semana e SOD em U/g Hb).

Existe pouca informação sobre a variação biológica das enzimas antioxidantes em populações representativas e esta informação é muitas vezes contraditória, em parte, devido à falta de padronização e às diferenças entre os métodos de doseamento utilizados nos estudos (por exemplo: tipos de substratos usados e precisão das determinações) e às diferenças entre as populações estudadas. Todos estes factores vão afectar os resultados e o grau de significância dos mesmos.

As actividades das enzimas antioxidantes variam muito de tecido para tecido e as condições ambientais poderão só afectar as actividades nos órgãos susceptíveis. Neste trabalho, escolheram-se os eritrócitos, visto serem células expostas a um *stress* oxidativo constante devido à geração contínua de radicais de oxigénio pela autooxidação da hemoglobina. Infelizmente só foi possível determinar a actividade eritrocitária da SOD, dado a técnica disponível para a determinação da GPX eritrocitária ter apresentado vários problemas que demonstraram pouca fiabilidade dos resultados obtidos, o que levou à sua substituição por uma técnica em plasma.

Apesar destas limitações, tentou-se estabelecer alguns padrões de variação para estas duas enzimas.

Em relação à idade obteve-se uma correlação negativa para a SOD ( $r=0,200$ ) (figura 9) e nenhuma correlação com a GPX. Estes resultados estão de acordo com alguma literatura sobre este assunto, especialmente para a SOD, para a qual é indicado um decréscimo com a idade em vários estudos<sup>87,88,89</sup>. Os resultados para a GPX são mais variáveis, indicando uma subida dos seus níveis, quer plasmáticos quer eritrocitários<sup>88</sup> ou uma diminuição da concentração eritrocitária<sup>89</sup> com a idade.

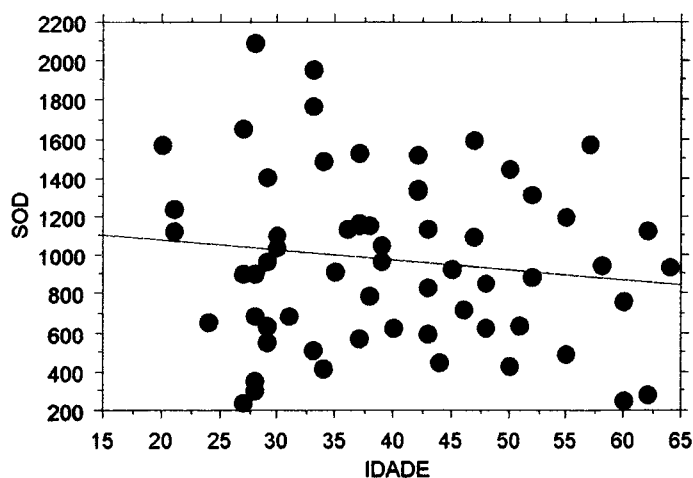


Figura 9 - Representação gráfica da correlação entre idade e concentração eritrocitária de SOD (SOD expressa em U/g Hb).



Em relação ao sexo, não se obtiveram diferenças para a GPX e obtiveram-se valores um pouco mais elevados, nos homens, para a SOD (valores médios: Masc=1082±417 U/g Hb; Fem=927±415 U/g Hb).

A correlação de três variáveis, idade, sexo e SOD, representada na figura 10, mostra uma diminuição com a idade e valores de SOD superiores nos homens, em quase todos os escalões etários.

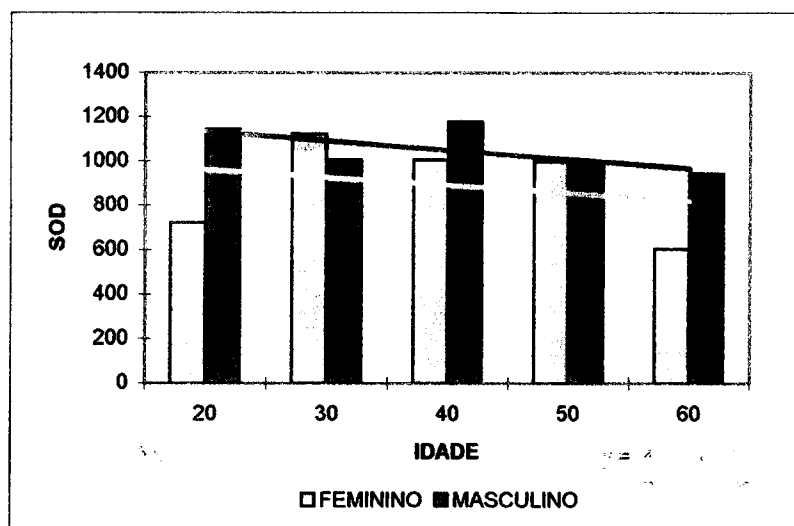


Figura 10 – Representação gráfica da correlação entre idade, sexo e concentração eritrocitária de SOD (SOD expressa em U/g Hb).

O mesmo tipo de comparação mas desta vez entre idade, consumo de bebidas alcoólicas e SOD (figura 11) mostra, para os consumidores, uma tendência para manter ou fazer subir ligeiramente os níveis de SOD com a idade, enquanto que para os não consumidores a variação com a idade é mais irregular, embora com tendência para baixar. Estes resultados parecem apontar para um efeito protector da ingestão de bebidas alcoólicas, através da manutenção dos níveis da SOD em escalões etários para os quais a concentração da enzima começa a diminuir.

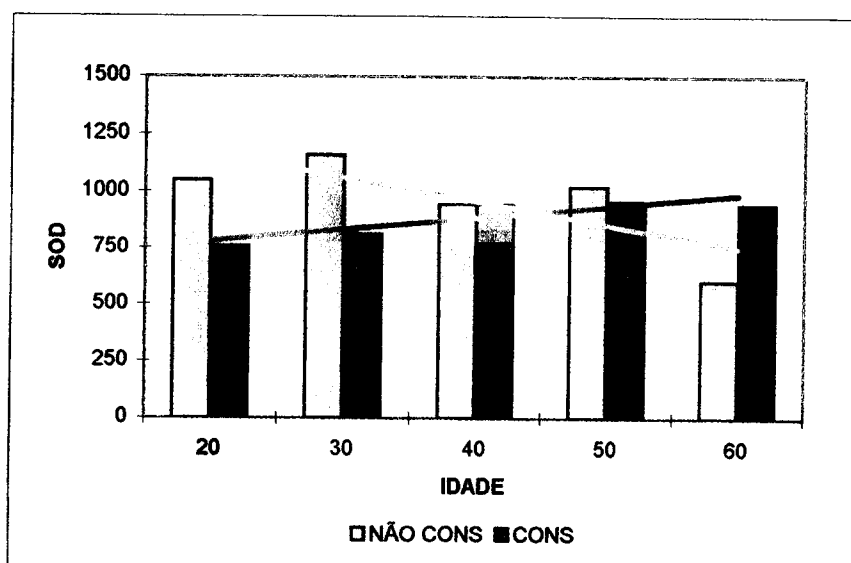


Figura 11 – Representação gráfica de correlação entre idade, consumo de bebidas alcoólicas e concentração eritrocitária de SOD (SOD expressa em U/g Hb).

Para a GPX não foi possível estabelecer nenhuma relação das referidas nos dois parágrafos anteriores.

Em relação ao consumo de tabaco, os fumadores apresentam valores tendencialmente mais baixos tanto da SOD como da GPX, embora sem significado estatístico. Este último pormenor está mais de acordo com o facto de os níveis de GPX se correlacionarem positivamente com o consumo de tabaco ( $r=0,454$ ) enquanto que a SOD se correlaciona de um modo negativo ( $r=0,344$ ). Como em relação a outras variáveis até agora referidas, a literatura é contraditória, com estudos a apontar para uma diminuição das actividades enzimáticas para os fumadores<sup>88</sup> e outros a indicar um aumento<sup>89,90</sup>.

As comparações entre as GPX e os lípidos levaram à obtenção de correlações positivas com a HDL ( $r=0,252$ ), com a LDL ( $r=0,360$ ) e com a Lp(a) ( $r=0,242$ ). As correlações com a SOD foram todas fracas.

## II.4. PEROXIDAÇÃO LÍPIDICA

Um dos pré-requisitos para a formação de partículas de LDL que possam ser internalizadas pelos macrófagos, pela via "scavenger", é a decomposição dos peróxidos lípidicos a aldeídos. O MDA, o 4-HNE e provavelmente outros aldeídos (que são produtos finais da peroxidação lípidica) gerados nas partículas de LDL parecem ser responsáveis pela criação de novos epítopes na apoB que tornam esta molécula reconhecível pelos receptores "scavenger".

Os consumidores de bebidas alcoólicas apresentam valores dos marcadores de peroxidação lípidica totais superiores aos não consumidores, diferença essa com significado estatístico. O mesmo não se verifica para o MDA isolado. Estes resultados apontam para uma maior produção de 4-hidroxicenais pelos consumidores, como produto final da peroxidação lípidica. Este dado é importante, visto a determinação da concentração dos hidroxicenais ser provavelmente mais significativa que a do MDA, pois os primeiros são muito mais citotóxicos<sup>50</sup>.

Estes resultados são, à primeira vista, contraditórios pois parecem negar o efeito protector da ingestão de bebidas alcoólicas. Como foi referido até agora, o consumo de álcool aumenta o *status* antioxidante total e algumas das defesas antioxidantes. Assim sendo, talvez o efeito protector contra a peroxidação lípidica se faça, não pela redução dos seus níveis, mas sim pela indução de defesas contra ela. Se se formarem os aldeídos mas estes não se poderem, por exemplo, ligar à apoB e exercer o seu efeito deletério, haverá menor modificação da LDL, menor formação de células "foamr", via internalização da oxLDL pelos macrófagos.

Existe uma correlação positiva entre MDA+4HNE e apoB ( $r=0,203$ ), Lp(a) ( $r=0,467$ ), HDL ( $r=0,214$ ) e consumo de bebidas alcoólicas ( $r=0,206$ ).

Para o MDA isolado só se obteve correlação com o consumo ( $r=0,109$ ), *status* ( $r=0,338$ ) e colesterol total ( $r=0,228$ ).

A relação com o consumo poderá ser explicada por hábitos alimentares dos consumidores que provoquem um aumento da peroxidação lípidica. Este aspecto necessitaria de um estudo mais profundo da alimentação e hábitos deste grupo. Como foi referido na Introdução, os consumidores de bebidas alcoólicas têm geralmente estilos de vida diferentes dos abstémios, o que talvez leva à existência de maiores níveis de peroxidação. Os consumidores regulares de bebidas alcoólicas apresentam

uma maior percentagem de fumadores e, em geral, consomem mais gorduras saturadas<sup>34</sup>. Alguns estudos apontam para maiores níveis de peroxidação das lipoproteínas plasmáticas e dos lípidos da LDL em particular, em dietas enriquecidas em gorduras saturadas<sup>91</sup>. Neste trabalho foi particularmente difícil fazer a quantificação correcta do tipo de gorduras ingeridas e preferidas (se as houver) por cada grupo de consumo.

Foi possível obter uma relação entre MDA+4HNE com a idade, quando se separou os géneros (figura 12), com um aumento, tanto nos homens como nas mulheres à medida que a idade aumenta. Não se encontrou nenhuma relação significativa entre níveis de MDA+4HNE, idade e consumo de bebidas alcoólicas.

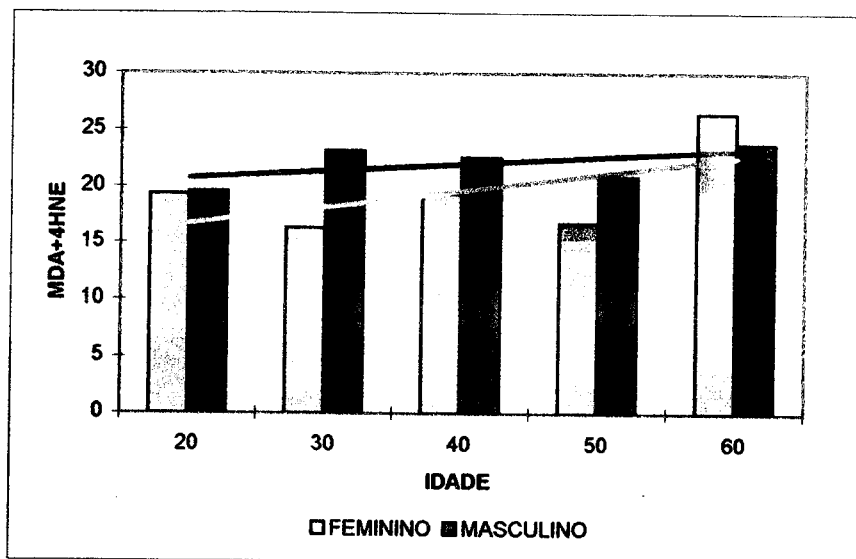


Figura 12 – Representação gráfica da correlação entre idade, sexo e concentração plasmática de MDA+4HNE (MDA+4HNE expresso em  $\mu\text{M}$ ).

### III. CONCLUSÕES

Como já foi referido os objectivos deste trabalho compreendiam o estabelecimento numa amostragem da população portuguesa, do efeito protector da ingestão de bebidas alcoólicas, efeito esse mediado pelo aumento dos níveis séricos da lipoproteína HDL e pelo aumento da capacidade antioxidante do soro humano. Em relação à capacidade antioxidante, outro objectivo era a obtenção de dados sobre os possíveis contribuintes para esse aumento.

Apesar do pequeno tamanho da amostragem que serviu de base ao trabalho, foi possível estabelecer que a ingestão de bebidas alcoólicas, independentemente do tipo (embora se saliente a preferência pelo vinho tinto) causa:

- Aumento dos níveis séricos da HDL
- Aumento do *status* antioxidante total sérico

Dentro dos antioxidantes verificou-se, com o consumo de bebidas alcoólicas:

- Aumento da concentração sérica de ácido úrico

Em relação aos níveis de peroxidação lípidica, verificou-se:

- Aumento dos níveis de MDA+4HNE

É interessante referir o facto dos não consumidores que participaram neste trabalho terem um estilo de vida mais saudável, com mais consumo de alimentos vegetais, mais peixe e praticarem mais exercício físico e mesmo assim terem níveis inferiores de HDL e de *status* antioxidante. Sobre o consumo de gorduras apenas se conseguiu apurar que os consumidores comem mais carne, ingerindo assim mais gorduras saturadas o que poderá ser responsável pelos níveis superiores de MDA+4HNE.

Qualquer um destes resultados necessita de confirmação numa amostragem maior e mais representativa da população portuguesa. Este facto é particularmente notório nas enzimas antioxidantes, que por si só parecem ter uma grande variação biológica e a sua determinação ser afectada por vários factores. Parece, no entanto, haver uma tendência para o aumento dos seus níveis com o consumo de bebidas alcoólicas. Seria igualmente interessante o seu estudo em mais do que um tecido, particularmente nas células envolvidas na aterogénese.

A mais longo prazo e confirmado o aumento dos níveis plasmáticos da SOD e da GPX, seria de estudar o modo como é induzido esse aumento: subida dos níveis de síntese ou manutenção/abaixamento da taxa de destruição.

Para enriquecer o estudo sobre as contribuições para o aumento do *status* antioxidante total, seria importante a determinação dos níveis de outros antioxidantes, nomeadamente as vitaminas E e C e algumas proteínas como a transferrina, dado os sais de ferro estimularem a peroxidação lípidica pela geração de radicais livres de oxigénio.

*BIBLIOGRAFIA*

1. Murdaugh, Q. & Vanderboom, C. Individual and Community Models For Promoting Wellness. *J Cardio Nursing* 1997; 11: 1-14.
2. Durrington, P. Preventive Cardiology. 1993, Martin Dunitz Ltd, London.
3. Assmann, G. Lipid Metabolism Disorders and Coronary Heart Disease. 1993 MMV Medizin Verlag, München.
4. Stein, O & Stein, Y. Atherogenic Lipoproteins in Primary Hyperlipoproteinemias. 1991, McGraw-Hill Inc.
5. Strong, JP. Natural History and Risk Factors for Early Human Atherogenesis. *Clin Chem* 1995; 41: 134-138.
6. Ross, R. The Pathogenesis of Atherosclerosis - An Update. *N Engl J Med* 1986; 314: 488-500.
7. Thompson, GR. Progression and Regression of Coronary Artery Disease. *Curr Opin Lipidol* 1992; 3: 263-267.
8. Havenith, MG & Gotlieb, AI. Atherogenesis in Primary Hyperlipoproteinemias. 1991, McGraw-Hill Inc.
9. Benditt, EP & Benditt, JM. Evidence for a Monoclonal Origin of Human Atherosclerotic Plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 1753.
10. Marshall, WJ. Lipids and Lipoproteins in Clinical Chemistry. 1988, Gower Medical Publ.
11. Assmann, G. Lipid Metabolism and Atherosclerosis. 1982, Schattauer Verlag, Stuttgart, Germany.
12. Grundy, SM. Role of Low-Density Lipoproteins in Atherogenesis and Development of Coronary Heart Disease. *Clin Chem* 1995; 41: 139-146.
13. Kane, JP & Malloy, MJ. Disorders of Lipoprotein Metabolism in Basic & Clinical Endocrinology, 4th Ed. 1994, Prentice-Hall International Inc. Appleton & Lange, Norwalk, CT.
14. Roheim, PS & Asztalos, BF. Clinical Significance of Lipoprotein Size and Risk for Coronary Atherosclerosis. *Clin Chem* 1995; 41: 147-152.
15. Steinberg, D, Parthasarathy, S, Carew, TE *et al.* Beyond Cholesterol: Modifications of Low-Density Lipoprotein That Increase Its Atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 15-23.
16. Austin, MA, King, MC, Vranizan, KM & Krauss, RM. Atherogenic Lipoprotein Phenotype: A Proposed Genetic Marker For Coronary Heart Disease Risk. *Circulation* 1990; 82: 495-506.
17. Thompson, GR. Lipoprotein Metabolism in Handbook of Hyperlipidaemia. 1989, MSD.



18. Chapman, MJ, Huby, T, Nigon, F & Thillet, J. Lipoprotein (a): Implications in Atherothrombosis. *Atherosclerosis* 1994; **110** (Suppl): S69-S75.
19. Scanu, AM. Structural and Functional Polymorphism of Lipoprotein (a): Biological and Clinical Implications. *Clin Chem* 1995; **41**: 170-172.
20. Eisenberg, S. Plasma Lipoproteins: Structure, Composition, Classification and Metabolism in Primary Hyperlipoproteinemias. 1991, McGraw-Hill Inc.
21. Siest, G, Pillot, T, Régis-Bailly, A, Leininger-Muller, B *et al.* Apolipoprotein E: An Important Gene and Protein to Follow in Laboratory Medicine. *Clin Chem* 1995; **41**: 1068-1086.
22. Wilson, PWF. Relation of High Density Lipoprotein Subfractions and Apolipoprotein E Isoforms to Coronary Disease. *Clin Chem* 1995; **41**: 165-169.
23. Rimm, EB, Giovannucci, EL, Willet, WC *et al.* Prospective Study of Alcohol Consumption and Risk of Coronary Disease in Men. *Lancet* 1991; **339**: 464-468.
24. Goldberg, DM. Does Wine Work? *Clin Chem* 1995; **41**: 14-16.
25. Lazarus, NB, Kaplan, GA, Cohen, RD & Leu, D. Change in Alcohol Consumption and Risk of Death From All causes and From Ischaemic Heart Disease. *BMJ* 1991; **303**: 553-556.
26. Stampfer, MJ, Graham, MD, Colditz, MB, Willet, WC *et al.* A Prospective Study of Moderate Alcohol Consumption and the Risk of Coronary Disease and Stroke in Women. *N Engl J Med* 1991; **319**: 267-273.
27. Doll, R. Mortality in Relation to Consumption of Alcohol: 13 Years' Observations on Male British Doctors. *BMJ* 1994; **309**: 911-918.
28. Fraser, GE, Anderson, JT, Foster, N *et al.* Moderate Alcohol Intake, Increased Levels of High-Density Lipoprotein (HDL). *Atherosclerosis* 1983; **46**: 275-286.
29. Gaziano, JM, Buring, JE, Breslow, JL *et al.* Moderate Alcohol Intake, Increased Levels of High-Density Lipoprotein and Its Subfractions and Decreased Risk of Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 1993; **329**: 1829-1834.
30. Shaper, AG, Wannamethee, G & Walter, M. Alcohol and Mortality in British Men: Explaining the U-Shaped Curve. *Lancet* 1988; **ii**: 1267-1273.
31. Jackson, R, Scragg, R & Beaglehole, R. Alcohol Consumption and Risk of Coronary Heart Disease. *BMJ* 1991; **303**: 211-216.
32. Marmot, M & Brunner, E. Alcohol and Cardiovascular Disease: The Status of the U-Shaped Curve. *BMJ* 1991; **303**: 565-568.
33. Renaud, S & De Lorgeril, M. Wine, Alcohol, Platelets and the French Paradox for Coronary Heart Disease. *Lancet* 1992; **339**: 1523-1526.
34. Jackson, R & Beaglehole, R. The Relationship Between Alcohol and Coronary Heart Disease: Is There a Protective Effect? *Curr Opin Lipidol* 1993; **4**: 21-26.

35. St. Leger, AS, Cochrane, AL & Moore, F. Factors Associated with Cardiac Mortality in Developed Countries with Particular Reference to the Consumption of Wine. *Lancet* 1979; i: 1017-1020.
36. Rimm, EB, Klatsky, A, Grobbee, D & Stampfer, MJ. Review of Moderate Alcohol Consumption and Reduced Risk of Coronary Heart Disease: Is the Effect Due to Beer, Wine or Spirits? *BMJ* 1996; 312: 731-736.
37. Urbano-Márquez, A, Estruch, R, Fernández-Solá, J *et al.* The Greater Risk of Alcoholic Cardiomyopathy and Myopathy in Women Compared With Men. *JAMA* 1995; 274: 1491-54.
38. Grønbaek, M, Deis, A, Sørensen, T *et al.* Influence of Sex, Age, Body Mass Index and Smoking on Alcohol Intake and Mortality. *BMJ* 1994; 308: 302-306.
39. Goldberg, DM, Hahn, SE & Parkes, JG. Beyond Alcohol: Beverage Consumption and Cardiovascular Mortality. *Clin Chim Acta* 1995; 237: 155-187.
40. Hein, HO, Suadicani, P & Gyntelberg, F. Alcohol Consumption, Serum Low Density Lipoprotein Cholesterol Concentration and Risk of Ischaemic Heart Disease: Six Year Follow-Up in the Copenhagen Male Study. *BMJ* 1996; 312: 736-741.
41. Lecomte, E, Herbeth, B, Paille, F *et al.* Changes in Serum Apolipoprotein and Lipoprotein Profile Induced by Chronic Alcohol Consumption and Withdrawal: Determinant Effect on Heart Disease? *Clin Chem* 1996; 42: 1666-1675.
42. Riemens, SC, van Tol, A, Hoogenberg, K *et al.* Higher High Density Lipoprotein Cholesterol Associated With Moderate Alcohol Consumption Is Not Related to Altered Plasma Lecithin: Cholesterol Acyltransferase and Lipid Transfer Protein Activity Levels. *Clin Chim Acta* 1997; 258: 105-115.
43. Burton, GW & Ingold, KU. Mechanisms of Antioxidant Action: Preventive and Chain-Breaking Antioxidants in CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, Vol.II. 1989; CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
44. Esterbauer, H, Wäg, G & Puhl, H. Lipid Peroxidation and Its Role in Atherosclerosis. *B Med Bull* 1993; 49: 566-576.
45. Maier, JAM, Barenghi, L, Bradamante, S & Pagani, F. Induction of Human Endothelial Cell Growth by Mildly Oxidized Low Density Lipoprotein. *Atherosclerosis* 1996; 123: 115-121.
46. Bruckdorfer, KR. Free Radicals, Lipid Peroxidation and Atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1990; 1: 529-533.
47. Parthasarathy, S & Steinberg, D. Cell-Induced Oxidation of LDL. *Curr Opin Lipidol* 1992; 3: 313-317.
48. Wayner, DD, Burton, GW, Ingold, K *et al.* The Relative Contributions of Vitamin E, Urate, Ascorbate and Proteins to the Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Activity of Human Blood Plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924: 408-419.

49. Halliwell, B & Gutteridge, JMC. Protection Against Oxidants in Biological Systems: The Superoxide Theory of Oxygen Toxicity *in* Free Radicals in Biology and Medicine. 1989. Clarendon Press, Oxford.
50. Halliwell, B & Gutteridge, JMC. Lipid Peroxidation: A Radical Chain Reaction *in* Free Radicals in Biology and Medicine. 1989. Clarendon Press, Oxford.
51. Jialal, I & Scaccini, C. Antioxidants and Atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1992; 3: 324-328.
52. Berry, EM. The Effects of Nutrients on Lipoprotein Susceptibility to Oxidation. *Curr Opin Lipidol* 1992; 3: 5-11.
53. Reaven, PD, Khouw, A, Beltz, WF *et al.* Effect of Dietary Antioxidant Combinations in Humans - Protection of LDL by Vitamin E But Not by  $\beta$ -Carotene. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 590-600.
54. Rimm, EB, Stampfer, MJ, Ascherio, A *et al.* Vitamin E Consumption and The Risk of Coronary Heart Disease in Men. *N Engl J Med* 1993; 328: 1450-1455.
55. Porkkala-Sarataho, E, Nyssönen, K & Salonen, JT. Increased Oxidation Resistance of Atherogenic Plasma Lipoproteins at High Vitamin E Levels in Non-Vitamin E Supplemented Men. *Atherosclerosis* 1996; 124: 83-94.
56. Seccia, M, Albano, E & Bellomo, G. Suitability of Chemical *in vitro* Models to Investigate LDL Oxidation: Study With Different Initiating Conditions in Native and  $\alpha$ -Tocopherol Supplemented LDL. *Clin Chem* 1997; 43: 1436-1441.
57. Klatsky, AL & Armstrong, MA. Alcoholic Beverage Choice and Risk of Coronary Artery Disease Mortality: Do Red Wine Drinkers Fare Best? *Am J Cardiol* 1993; 71: 467-469.
58. Criqui, MH & Ringel, BL. Does Diet or Alcohol Explain the French Paradox? *Lancet* 1994; 344: 1719-1723.
59. Nanji, AA & French, SW. Alcoholic Beverages and Coronary Heart Disease. *Atherosclerosis* 1986; 60: 197-198.
60. Juhan-Vague, I. Haemostatic Parameters and Vascular Risk. *Atherosclerosis* 1996; 124 (Suppl): S49-S55.
62. Renaud, SC, Beswick, AD, Fehily, AM *et al.* Alcohol and Platelet Aggregation: The Caerphilly Prospective Heart Disease Study. *Am J Nutr* 1992; 55: 1012-1017.
63. Ridker, PM, Vaughan, DE, Stampfer, MJ *et al.* Association of Moderate Alcohol Consumption and Plasma Concentration of Endogenous Tissue-Type Plasminogen Activator. *JAMA* 1994; 272: 929-933.
64. Kanner, J, Frankel, E, Granit, R *et al.* Natural Antioxidants in Grapes and Wines. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 64-69.

65. Hertog, MGL, Hollman, PCH & van de Putte, B. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines and Fruit Juices. *J Agric Food Chem* 1993; **41**: 1242-1246.
66. Husain, SR, Cillard, J & Cillard, P. Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Flavonoids. *Phytochemistry* 1987; **26**: 2489-2491.
67. Viana, M, Barbas, C, Bonet, B *et al.* *In Vitro* Effects of a Flavonoid-Rich Extract on LDL Oxidation. *Atherosclerosis* 1996; **123**: 83-91.
68. Pace-Asciak, CR, Hahn, S, Diamandis, EP *et al.* The Red Wine Phenolics *trans*-Resveratrol and Quercetin Block Human Platelet Aggregation and Eicosanoid Synthesis: Implications for Protection Against Coronary Heart Disease. *Clin Chim Acta* 1995; **235**: 207-219.
69. Hertog, MGL, Feskens, EJM, Hollman, PCH *et al.* Dietary Antioxidant Flavonoids and Risk of Coronary Heart Disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; **342**: 1007-1011.
70. Singleton, VL. Grape and Wine Phenolics; Background and Prospects in Singleton VL, ed. *Proceedings of the Symposium: Grape and Wine Centennial*, 1980. Davis, CA: University of California Press, 1982; 215-227.
71. Frankel, EN, Kanner, J, German, JB *et al.* Inhibition of Oxidation of Human Low-Density Lipoprotein by Phenolic Substances in Red Wine. *Lancet* 1993; **341**: 454-457.
72. Fitzpatrick, DF, Hirschfield, SL & Coffey, RG. Endothelium-Dependent Vasorelaxing Activity of Wine and Other Grape Products. *Am J Physiol* 1993; **265**: H774-H778.
73. Whitehead, TP, Robinson, D, Allaway, S *et al.* Effect of Red Wine Ingestion on the Antioxidant Capacity of Serum. *Clin Chem* 1995; **41**: 32-35.
74. Teissedre, P-L, Waterhouse, AL & Frankel, EN. Principal Phenolic Phytochemicals in French Syrah and Grenache Rhone Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low Density Lipoproteins. *J Inter Sciences de la Vigne et du Vin* 1995; **29**: 205-212.
75. Kerry, NL & Abbey, M. Red Wine and Fractionated Phenolic Compounds Prepared from Red Wine Inhibit Low Density Lipoprotein Oxidation *in vitro*. *Atherosclerosis* 1997; **135**: 93-102.
76. Hurtado, I, Caldú, P, Gonzalo, A, *et al.* Antioxidative Capacity of Wine on Human LDL Oxidation *in vitro*: Effect of Skin Contact in Winemaking of White Wine. *J Agric Food Chem* 1997; **45**: 1283-1289.
77. De Whalley, CV, Rankin, S, Hoult, JR *et al.* Flavonoids Inhibit the Oxidative Modification of Low Density Lipoproteins by Macrophages. *Biochem Pharm* 1990; **39**: 1743-1751.

78. Kinsella, J, Frankel, E, German, B & Kanner, J. Possible Mechanisms for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods. *Food Technol* 1993; **47**: 85-89.
79. Conselho Nacional de Alimentação e Nutrição (CNAN). Recomendações Para a Educação Alimentar da População Portuguesa. 1997 CNAN.
80. Balança Alimentar Portuguesa (1980-1992). Instituto Nacional de Estatística/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.
81. Estatísticas da Saúde, 1996. Instituto Nacional de Estatística.
82. Thompson, GR. Plasma Lipids and Lipoproteins *in* Handbook of Hyperlipidaemia. 1989, MSD.
83. Phillips, NR, Havel, RJ & Kane, JP. Levels and Interrelationships of Serum and Lipoprotein Cholesterol and Triglycerides. Association With Adiposity and the Consumption of Ethanol, Tobacco and Beverages Containing Caffeine. *Arteriosclerosis* 1981; **1**: 13-24.
84. Sharpe, PC, McGrath, LT, McClean, E, Young, IS & Archbold, GP. Effect of Red Wine Consumption on Lipoprotein (a) and Other Risk Factors for Atherosclerosis. *QJM* 1995; **88**: 101-108.
85. Fontana, P, Bovet, P *et al*. Inverse Association Between Alcohol Intake and Serum Lipoprotein (a). Pánel apresentado no 66th Congress of the European Atherosclerosis Society, 1997, Florença, Itália.
86. Day, A & Stansbie, D. Cardioprotective Effect of Red Wine May Be Mediated by Urate [Letter]. *Clin Chem* 1995; **41**: 1319-1320.
87. Andersen, HR, Nielsen, JB, Nielsen, F *et al* Grandjean, P. Antioxidative Enzyme Activities in Human Erythrocytes. *Clin Chem* 1997; **43**: 562-568.
88. Guemouri, L, Artur, Y, Herbeth, B *et al*. Biological Variability of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Catalase in Blood. *Clin Chem* 1991; **37**: 1932-1937.
89. Ceballos-Picot, I, Trivier, JM, Nicole, A, Sinet, PM & Thevenin, M. Age-Related Modifications of Copper-Zinc Superoxide Dismutase and Glutathione-Related Enzyme Activities in Human Erythrocytes. *Clin Chem* 1992; **38**: 66-70.
90. Toth, KM, Berger, EM, Beehler, CJ, Repine, JE. Erythrocytes From Cigarette Smokers Contain More Glutathione and Catalase and Protect Endothelial Cells From Hydrogen Peroxide Better than Do Erythrocytes from Nonsmokers. *Ann Ver Respir Dis* 1986; **34**: 281-284.
91. Berry, EM, Eisenberg, S, Friedlander, Y *et al*. Effects of Diets Rich in Monounsaturated Fatty Acids on Plasma Lipoproteins. The Jerusalem Nutrition Study: Monounsaturated vs Saturated Fatty Acids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1995; **5**: 55-62.