UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

INFLUÊNCIA DA IDADE DE DOADORAS HUMANAS SOBRE A ESTABILIDADE DE SEUS ERITRÓCITOS

Estudante: **Cynthia Barbosa Firmino**

UBERLÂNDIA, MG
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

INFLUÊNCIA DA IDADE DE DOADORAS HUMANAS SOBRE A ESTABILIDADE DE SEUS ERITRÓCITOS

Estudante: **Cynthia Barbosa Firmino**
Orientador: Professor Dr. **Nilson Penha-Silva**

UBERLÂNDIA, MG
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

INFLUÊNCIA DA IDADE DE DOADORAS HUMANAS SOBRE A ESTABILIDADE DE SEUS ERITRÓCITOS

Estudante: **Cynthia Barbosa Firmino**
Orientador: Professor Dr. **Nilson Penha-Silva**

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área de Bioquímica)

UBERLÂNDIA, MG
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F525i Firmino, Cynthia Barbosa, 1957-
Influência da idade de doadoras humanas sobre a estabilidade de seus eritrócitos / Cynthia Barbosa Firmino - 2007.
89 f.: il.

Orientador: Nilson Penha-Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Células - Envelhecimento - Teses. 2. Eritrócitos - Teses. I. Penha-Silva, Nilson. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 576.36

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

Palavras-chaves: Envelhecimento; eritrócitos, estabilidade de eritrócitos; estabilidade de membranas; mini-avaliação nutricional; temperatura.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

INFLUÊNCIA DA IDADE DE DOADORAS HUMANAS SOBRE A ESTABILIDADE DE SEUS ERITRÓCITOS

Estudante: **Cynthia Barbosa Firmino**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Presidente: Professor Dr. Nilson Penha-Silva (Orientador)
Examinador: Professor Dr. Marcelo Matos Santoro (UFMG)
Examinador: Professora Dra. Maria Goreti de Almeida Oliveira (UFV)
Examinador: Professor Dr. Fernando Barbosa Júnior (USP)
Examinador: Professora Dra. Neide Maria da Silva (UFU)

DATA DE DEFESA: 28/02/2007

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Professor Dr. **Nilson Penha-Silva**
(Orientador)

“Somos a criação dos passos da aprendizagem que um dia começou a surgir em uma célula e nunca mais parou. Começou com um, terminou com 10 e hoje, por todo o mundo, a ciência é responsável por todos os passos de um começo que nunca termina. De Aristóteles, Platão a Einstein, todos somos por dentro uma única célula responsável por toda a sabedoria da procura da ciência que no fundo é uma parede que todos podemos construir.”

Sananda

Dedico este trabalho a todos aqueles que, invisíveis ou não aos meus olhos, estão sempre me amparando e me ensinando a caminhar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da UFU pela oportunidade que me deu de ingressar em seu corpo discente;

Agradeço ao Professor Nilson Penha-Silva pela dedicação, auxílio e principalmente pela confiança depositada em mim;

Agradeço a Deus pela força nos momentos difíceis, porque realmente a fé remove montanhas;

Agradeço aos meus pais Rubens e Normy pelo apoio; tenham a certeza de que vocês fazem parte dessa história;

Agradeço às minhas filhas Domitilla e Lívia, pela paciência e por terem suportado minha ausência nestes últimos anos;

Agradeço à Morey, Sananda, Amuna, Melk, Seighy, Guia, Júnior e a todos da Fraternidade que, direta e indiretamente, me auxiliaram nesta jornada com seus exemplos de competência e humildade;

Agradeço às amigas de pesquisa Juliana Carla da Costa Huss, Tatiana Maria Theodoro de Souza, Mariana Vaini de Freitas, Rita de Cássia Mascarenhas Netto e Francislene Glória de Freitas Reis, por todos os momentos que passamos juntas e pelo inestimável companheirismo e colaboração;

Agradeço a todos os amigos da Escola Técnica de Saúde (UFU), que muito me incentivaram, principalmente ao Professor Sebastião Marcos Taffuri;

Agradeço a todas as voluntárias que sempre estiveram dispostas a colaborar;

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma estiveram comigo neste trabalho.

Sumário

Página

Abreviaturas..... viii

Introdução..... 1

Capítulo 1 (Revisão da literatura) Envelhecimento, estrutura e estabilidade de membranas biológicas..... 4

O que é envelhecimento..... 5

O envelhecimento populacional e a necessidade sócio-político-econômica de entender o envelhecimento..... 6

Por que envelhecemos?..... 6

Como envelhecemos?..... 8

Degeneração oxidativa e envelhecimento..... 9

Radicais livres e metabólitos reativos do oxigênio (ROM)..... 11

A reatividade intracelular dos metabólitos reativos do oxigênio..... 12

Estrutura, composição e fluidez das membranas biológicas..... 13

Mecanismos de defesa e reparo dos danos oxidativos..... 15

Os eritrócitos como modelo de estudo..... 17

A estabilidade de eritrócitos..... 17

Efeito da temperatura sobre a estabilidade de eritrócitos..... 18

Influência da idade das voluntárias nos eritrócitos..... 20

A importância da nutrição..... 21

Considerações finais..... 24

Capítulo 2 (Trabalho experimental): Influência da idade sobre a estabilidade de eritrócitos humanos..... 25

Resumo..... 26

Abstract..... 27

Introdução..... 28

Material e métodos..... 31

Resultados..... 36

Discussão..... 48

Conclusões..... 55

Referências bibliográficas..... 56

Anexo..... 79

ABREVIATURAS

A_1	Absorvância antes da transição de desnaturação dos eritrócitos
A_2	Absorvância depois da transição de desnaturação dos eritrócitos
CTE	Cadeia de Transporte de Elétrons
D	Desnaturante
D_{50}	Concentração do desnaturante que produz 50% de hemólise
dD	Amplitude da transição de desnaturação
Estado R	Estado expandido dos eritrócitos
Estado T	Estado compactado dos eritrócitos
MNA	Mini-Avaliação Nutricional (Mini-Nutritional Assessment)
N	Tamanho da amostra
P	Probabilidade da hipótese testada não ser verdadeira (0-1)
PUFA	Ácidos graxos polinsaturados
R	Coeficiente de correlação de Pearson
ROM	Metabólitos reativos do oxigênio
SFA	Ácidos graxos saturados
T	Temperatura absoluta, dada em Kelvin
T_m	Temperatura de “fusão” do complexo biológico, dada pelo ponto de meia-transição entre o estado nativo e o estado desnaturado do complexo biológico
UFA	Ácidos graxos insaturados
ω3-PUFA	Ácidos graxos polinsaturados da família ω3
ω6-PUFA	Ácidos graxos polinsaturados da família ω6

INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo degenerativo que limita a longevidade dos organismos vivos. Ele afeta as estruturas dos complexos organizacionais biológicos que determinam as funções responsáveis pela manutenção da condição vital.

Esses complexos organizacionais biológicos compreendem tecidos, células, organelas, cromossomos, proteínas e, particularmente, as membranas biológicas.

As membranas biológicas são responsáveis pela delimitação e definição de organelas, células e tecidos, mas também pelo transporte e controle do transporte de solutos entre os meios interno e externo do ambiente delimitado, bem como pela comunicação entre os ambientes que são definidos por elas.

A composição bioquímica de uma membrana depende de fatores genéticos, como a capacidade de expressão de suas proteínas e de enzimas envolvidas na biossíntese e degradação de seus aminoácidos e lipídeos.

Ela depende também da nutrição, que vai fornecer aminoácidos e ácidos graxos essenciais que vão constituir as estruturas de suas proteínas e lipídeos, respectivamente, além de vitaminas e outros fatores que possam protegê-la contra os danos degenerativos de que ela vai ser alvo.

Assim, a membrana também depende da intensidade e velocidade de degeneração de seus constituintes estruturais pelas agressões advindas do ambiente e do próprio metabolismo celular.

Os eritrócitos constituem um modelo de fácil obtenção, barato e conveniente, pela natureza cromogênica da hemoglobina, para estudo do comportamento das membranas biológicas.

O Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Uberlândia, sob a coordenação do Professor Dr. Nilson Penha-Silva, inicialmente comprometido com análise de estabilidade de enzimas, padronizou técnicas de análise da estabilidade de membranas de eritrócitos contra choque hipotônico e agentes caotrópicos naturais, como o etanol, a uréia e a temperatura.

Neste trabalho, a estabilidade de eritrócitos contra choque hipotônico, etanol e temperatura é analisada em função da idade de seus doadores.

O **capítulo 1** dessa tese faz uma revisão da literatura, buscando contextualizar o comportamento de membranas biológicas nas ciências do envelhecimento. Neste sentido procuramos abordar os conceitos básicos de

longevidade, envelhecimento, passando pelas teorias conhecidas que discutem porque e como os organismos vivos envelhecem. Estes conceitos permitem o estabelecimento de relações válidas entre a estrutura e o comportamento das membranas biológicas em função do ganho de idade.

O **capítulo 2** apresenta os estudos do efeito da temperatura sobre a análise da estabilidade de eritrócitos em função da idade de seus doadores, usando a diminuição da tonicidade ou o aumento na concentração de etanol como agentes caotrópicos. Os resultados deste estudo são analisados à luz das idéias correntes em Biogerontologia.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

ENVELHECIMENTO, ESTRUTURA E ESTABILIDADE DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS

O QUE É ENVELHECIMENTO

O envelhecimento é um processo natural da vida e não é definido de uma forma simples em termos biológicos. Ele não é uma mera manifestação da passagem do tempo, mas sim a manifestação de eventos degenerativos que ocorrem ao longo da vida, seguindo ritmos diferentes em cada indivíduo [ARKING, 2006c]. Ele é caracterizado por declínios morfológicos, fisiológicos, moleculares e energéticos, que levarão o indivíduo à morte.

A longevidade média, que é a duração média da vida, é um conceito de natureza estatística e compreende as mortes provocadas por causas externas (acidentes, homicídios e suicídios) e aquelas provocadas por doenças (infecções e doenças degenerativas) [ARKING, 2006d]. Ela é determinada por fatores genéticos, que envolvem a vulnerabilidade ao desenvolvimento de infecções e de doenças degenerativas, mas também por fatores epigenéticos (alimentação e estilo de vida), sociais (alimentação, homicídios e suicídios) e aleatórios (acidentes) [ARKING, 2006d].

A longevidade máxima, que é a duração máxima da vida, compreende as mortes causadas apenas pelo envelhecimento. Ela também é determinada por fatores genéticos e epigenéticos, mas não por fatores aleatórios. Ela expressa mais adequadamente o potencial de duração da espécie.

O envelhecimento pode ser determinado por fatores genéticos, no que diz respeito à vulnerabilidade do organismo em sofrer degeneração, mas ele é essencialmente um processo determinado pelos fatores epigenéticos que determinam a degeneração crônica do organismo.

Segundo o paradigma geriátrico, essa degeneração compreende as doenças crônicas degenerativas. Mas segundo o paradigma biogerontológico, o envelhecimento deve ocorrer mesmo na ausência dessas doenças.

Os próprios fatores genéticos, como aqueles que predispõem o organismo ao desenvolvimento das doenças degenerativas e aqueles determinantes de doenças que causam envelhecimento precoce, podem diminuir a longevidade, mas não constituem uma regra geral na determinação do envelhecimento [ARKING, 2006d].

Assim, enquanto a longevidade reflete o potencial de duração da espécie, o envelhecimento reflete a degeneração epigenética produzida pelo desgaste estocástico dos complexos biológicos que determinam a vida.

O ENVELHECIMENTO POPULACIONAL E A NECESSIDADE SÓCIO-POLÍTICO-ECONÔMICA DE ENTENDER O ENVELHECIMENTO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a idade de 65 anos é o ponto de corte para definição do indivíduo como idoso. Esse limite é válido nos países desenvolvidos, onde a longevidade é atualmente maior do que nos países socialmente menos desenvolvidos. No Brasil, o ponto de corte é atualmente a idade de 60 anos, segundo o Ministério da Saúde.

O século XX foi caracterizado por progressos sociais e científicos que permitiram a ocorrência de um aumento da longevidade média da população. No Brasil, esse aumento ocorreu de forma acentuada a partir do ano de 1950 [VERAS, RAMOS e KALACHE, 1987; VERAS, COUTINHO e NEY, 1990].

Esse aumento na longevidade exige um posicionamento definido do estado e da nação no sentido de aumentar também a longevidade da saúde do indivíduo. Isso não somente por razões humanitárias, mas também por razões sociais e econômicas, uma vez que a extensão da vida significa também uma extensão das obrigações do estado e da nação com a promoção da saúde de seus cidadãos. O idoso nem sempre apresenta um quadro saudável em virtude de problemas sociais, políticos, econômicos, psicológicos, nutricionais e comportamentais [DEVLIN, 2000; MIÑANA e ROVIRA, 2001]. Este contexto sócio-político-econômico tem exigido a busca de informações sobre o envelhecimento.

POR QUE ENVELHECEMOS?

Se nada em biologia faz sentido exceto à luz da evolução [DOBZHANSKY,1973], o envelhecimento, então deve ter também razões evolucionárias. De fato, todas as teorias científicas modernas que procuram

encontrar a razão do envelhecimento têm implicações evolucionárias [AUSTAD, 1997; CLARK, 1999; ARKING, 2006b]. Como a evolução só faz sentido à luz da perpetuação da espécie, o envelhecimento deve estar associado à necessidade de perpetuar a espécie. Para perpetuar a espécie, a natureza poderia ter escolhido dois caminhos diferentes: uma longevidade ilimitada associada a uma baixa reprodutibilidade (para não gerar uma competição predatória entre os indivíduos) ou uma longevidade limitada associada a uma alta reprodutibilidade [MACARTHUR e WILSON, 1967].

Diante das condições naturalmente agressivas da natureza, investir na longevidade ilimitada e na baixa reprodutibilidade poderia colocar em risco a perpetuação da espécie, mas investir na longevidade limitada e na alta reprodutibilidade iria, por razões probabilísticas, favorecer a perpetuação da espécie. Segundo a **teoria do corpo descartável**, a natureza ficou com a segunda opção. A longevidade ilimitada demandaria o uso da energia disponível para o reparo das estruturas somáticas, em detrimento da reprodução, enquanto a longevidade limitada disponibilizaria mais energia para a tarefa da reprodução [KIRKWOOD, 1985; KIRKWOOD, 1987; KIRKWOOD, 1991; KIRKWOOD, 1999].

A diminuição da probabilidade de sobrevivência com o aumento da idade ocorreria para permitir a sobrevivência do indivíduo mais jovem, uma vez que se o idoso se mantivesse vivo ele competiria com o jovem pelo meio ambiente. Como o ganho de idade está associado à degeneração das células somáticas, mas não necessariamente das células germinais, o indivíduo jovem estaria mais apto a cumprir a tarefa de perpetuação da espécie [WEISMANN, 1891]. Se a tarefa do envelhecimento é excluir o idoso da competição com o jovem, por que o indivíduo idoso não morre após o término da idade reprodutiva? Simplesmente porque sua preservação é importante para assegurar a atenção parental necessária ao desenvolvimento do indivíduo jovem.

A evolução está intrinsecamente unida à preservação da espécie. As mutações que gerem indivíduos que se adaptem melhor ao ambiente são positivamente selecionadas, porque esses indivíduos terão uma melhor oportunidade de preservar a espécie. Assim, uma mutação positiva poderia estender seus benefícios para além da idade reprodutiva, garantindo uma maior longevidade. Mas mutações que gerem indivíduos que não se adaptam ao

ambiente são negativamente selecionadas, porque esses indivíduos não vão preservar seus genes mutantes em uma progênie numerosa, a menos que essa mutação negativa somente se manifeste além da idade reprodutiva. Assim, é possível que mutações negativas cujos efeitos somente se manifestem após a idade reprodutiva possam ser selecionadas. Mas, mesmo assim, por que esse tipo de mutação negativa seria selecionado? A resposta estaria na **teoria do pleiotropismo dualístico** [WILLIAMS, 1957]. A mutação com efeitos negativos após a idade reprodutiva deveria ter algum benefício para o indivíduo na idade reprodutiva. Um exemplo são as mutações que geraram a resposta inflamatória. No início da vida, a resposta inflamatória aumenta a probabilidade de sobrevivência pela resistência a infecções, mas na idade madura ela aumenta a probabilidade de morte por doença vascular aterosclerótica [VAN DEN BIGGELAAR *et al*., 2004]. Outro exemplo seriam as mutações que geraram uma maior disponibilização de colesterol para biossíntese de esteróides e reparo de injúrias a tecidos; elas favorecem o indivíduo na idade jovem, mas levam o indivíduo a sofrer degeneração vascular aterosclerótica mais tarde em sua vida.

COMO ENVELHECEMOS?

Esta pergunta nos remete aos mecanismos intrínsecos do envelhecimento e não às razões pelas quais nós envelhecemos.

Uma grande certeza da vida é que quem não morrer por outras causas irá envelhecer. No entanto, o envelhecimento se manifesta de maneira muito variável entre indivíduos da mesma espécie e entre indivíduos de espécies diferentes.

As teorias que procuram explicar como o envelhecimento ocorre podem ser classificadas em duas categorias: 1) teorias baseadas em eventos programados e 2) teorias estocásticas (HAYFLICK, 1994; HAYFLICK, 1998).

As teorias baseadas em eventos programados compreendem, dentre outras, a teoria neuro-endócrina, a teoria imunológica e a teoria genética [HAYFLICK, 1997; GUARENTE, 1999; GUARENTE e KENYON, 2000; MOTA, FIGUEIREDO e DUARTE, 2006]. Essas teorias são fundamentadas na existência de uma programação para o envelhecimento e a morte. Na realidade, a programação

queexiste é para a determinação da longevidade e da vulnerabilidade à degeneração estocástica do organismo.

As teorias estocásticas compreendem a teoria do desgaste, a teoria das mutações genéticas, a teoria dos erros e reparos, a teoria das ligações cruzadas e a teoria oxidativa [MACKAY, ORR e BEWLEY, 1990; HOLLOSZY e SCHECHTMAN, 1991; ORR e SOHAL, 1994; SOHAL, SOHAL e ORR, 1995; SOHAL e WEINDRUCH, 1996; LITHGOW, 1996; MOTA, FIGUEIREDO e DUARTE, 2006]. De uma maneira em geral o que essas teorias dizem é que o envelhecimento seria decorrente do acúmulo progressivo, aleatório e inespecífico de degenerações macroscópicas, microscópicas e submicroscópicas das estruturas orgânicas, inclusive o genoma, responsáveis pelas funções vitais de um organismo vivo [CRISTOFALO, GERHARD e PIGNOLO, 1994]. De uma maneira geral, o organismo responde ativamente aos estímulos de seu meio, adaptando-se rapidamente às novas circunstâncias. Os componentes estruturais das células, como DNA, proteínas e lipídeos, são protegidos para que todo o funcionamento seja garantido. O envelhecimento seria resultante do desequilíbrio entre a capacidade de atenuação e adaptação do organismo e a quantidade de danos degenerativos, com um acúmulo de degenerações estruturais e comprometimento das funções orgânicas [MOTA, FIGUEIREDO e DUARTE, 2006].

Esse acúmulo de degenerações estruturais determinaria não somente o envelhecimento, mas também a vulnerabilidade e a incidência de doenças degenerativas, com aumento da probabilidade de morte. Com o ganho de idade, declinaria a habilidade do organismo em reagir aos danos de origem exógena, como xenobióticos carcinogênicos, e endógena, como o estresse metabólico oxidativo [GERSHON e GERSHON, 1988; HAYFLICK, 1994; JURIVICH, QIU e WELK, 1997; AUSTAD, 1997; CLARK, 1999; KIRKWOOD, 1999; ARKING, 2006a].

DEGENERAÇÃO OXIDATIVA E ENVELHECIMENTO

Uma das manifestações da degeneração estocástica das estruturas de um organismo vivo seria a degeneração oxidativa, que pode ser combatida por antioxidantes endógenos e exógenos. O envelhecimento seria decorrente do acúmulo de degenerações resultantes do desequilíbrio entre a produção de substâncias oxidantes e a ação dos sistemas de defesa antioxidante [GUTTERIDGE, 1993; HARMAN, 1994; BECKMAN e AMES, 1998; HENSLEY *et al*., 2000; KASAPOGLU e OZBEN, 2001]. Esse desequilíbrio na homeostasia redox [RIKANS e HORNBROOK, 1997; FLOYD, 1991] constitui a base da chamada **teoria dos radicais livres** ou **teoria oxidativa** [HARMAN, 1956].

A imensa maioria dos organismos vivos retira energia de seus combustíveis celulares via metabolismo aeróbico, com a utilização do oxigênio da atmosfera, com exceção daqueles organismos especialmente adaptados para viver sob condições anaeróbicas [HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989]. A utilização do oxigênio nesse metabolismo ocorre na cadeia de transporte de elétrons, presente na membrana mitocondrial interna das células aeróbicas. É lá que é gerada a maior parte da energia proveniente do metabolismo e uma boa parte dos radicais livres.

Dentro de certos limites, os radicais livres são fisiologicamente necessários, como é o caso do óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), que em baixas concentrações atua como neurotransmissor e hormônio vasodilatador. Eles são produzidos e usados por macrófagos e neutrófilos para defender nosso organismo contra bactérias e fungos [HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989]. Eles podem atuar na sinalização celular [SEN, 2001] e nos processos de apoptose [SEN, 1998; JACKSON, 1999; HANCOCK, 2001; ZOPPI, 2005].

Mas quando há um desequilíbrio entre a produção, por um lado, e a demanda e capacidade de atenuação de seus efeitos, por outro lado, surge uma situação chamada de estresse oxidativo, trazendo efeitos colaterais deletérios para o organismo [CHOW, 1991; SMITH, MARKS e LIEBERMAN, 2004]. O primeiro alvo desse estresse oxidativo é a própria mitocôndria. Os ROM (Metabólitos Reativos do Oxigênio) podem reagir com as biomoléculas que constituem nossos complexos organizacionais. Eles atacam principalmente ácidos

graxos polinsaturados presentes nos fosfolipídeos de membrana, proteínas e ácidos nucléicos, produzindo danos que, enquanto podem ser reparados, não produzem conseqüências mais sérias para o organismo. Mas na medida em que a capacidade de reparo declina, os danos se acumulam estocasticamente, inclusive sobre genes determinantes da longevidade [HARMAN, 1991; REITER, 1995; MOTA, FIGUEIREDO e DUARTE, 2006].

RADICAIS LIVRES E METABÓLITOS REATIVOS DO OXIGÉNIO (ROM)

Um radical livre é definido como qualquer átomo, fragmento de molécula ou molécula que contenha um ou mais elétrons desemparelhados na sua camada de valência, ou seja, que contenha um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Um elétron não emparelhado é aquele que ocupa um orbital atômico ou molecular isoladamente e determina uma atração para um campo magnético, podendo tornar a substância altamente reativa [HALLIWELL, 1992; PERROTA e SHINAIDER, 1992].

Um radical livre é formado pela perda ou ganho de um elétron. Isso ocorre, por exemplo, quando uma ligação covalente é quebrada por fissão homolítica, ou seja, ao meio, e cada parte quebrada fica com um dos dois elétrons da ligação [FERREIRA e MATSUBARA, 1997].

Radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos do oxigênio, pois nem são todos que apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, como é o caso do ânion peróxido (O_2^{-2}). Os agentes patogênicos reativos do oxigênio são mais bem designados como metabólitos reativos do oxigênio (ROM) ou espécies reativas do oxigênio.

O oxigênio (O_2) é o aceptor final dos elétrons na cadeia de transporte de elétrons (CTE). No processo metabólico normal, que ocorre com 95 a 97% do O_2 que respiramos, a transferência de 4 elétrons para 1 molécula de O_2 produz a espécie óxido (O^{-2}), capaz de complexar prótons livres do meio e formar água (H_2O). Entretanto, de 3 a 5% do O_2 que respiramos vai gerar outros metabólitos reativos do oxigênio. Esses ROM compreendem o radical superóxido ($O_2^{\bullet}$) e o ânion peróxido (O_2^{-2}), formados na CTE quando 1 molécula de O_2 reage com 1 ou

2 elétrons, respectivamente [HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; COOPER *et al.*, 2002]. Mas há vários outros ROM, como o oxigênio singleto (O_2), o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), o radical peroxila ($ROO^{\bullet}$), o radical alcoxila ($RO^{\bullet}$), o radical hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o peroxinitrito ($ONOO^{-}$) e o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), dentre outros [ARUOMA, 1994; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; PEREIRA, 1994; SJODIN, WESTING e APLLE, 1990; YU, 1994].

Os ROM não são formados apenas na CTE. Alguns são produzidos inespecificamente por reações de oxirredução com metais de transição. A reação de Fenton,

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + OH^{-} \qquad (1.1)$$

tem sido proposta como a principal via de geração do radical hidroxila, *in vivo,* através da decomposição do peróxido de hidrogênio catalisada por metal, principalmente ferro [SIES, 1985].

Outro exemplo de ROM gerado fora da CTE é o peróxido de hidrogênio, que é formado nos peroxissomas pela ação de peroxidases. A produção de ROM ocorre também na resposta inflamatória, a partir do momento em que os neutrófilos produzem óxido nítrico, estes reagem rapidamente com superóxidos para gerar peroxinitrito e outros produtos tóxicos. Acrescentam-se ainda muitas drogas, a radiação natural, poluentes do ar e alguns produtos químicos que podem levar à formação de ROM no organismo [SEVANIAN e HOCHSTEIN, 1985; TIIDUS, 1998; NAVARRO *et al*., 1999; HARRISON, 2002].

A REATIVIDADE INTRACELULAR DOS METABÓLITOS REATIVOS DO OXIGÊNIO

Os radicais livres são muito instáveis e possuem uma meia-vida biológica muito curta. Para se estabilizarem, eles reagem rapidamente com fosfolipídeos de membranas, proteínas e ácidos nucléicos [HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990].

Os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídeos de membrana são os alvos mais vulneráveis dos ROM. Eles sofrem um processo oxidativo em cascata denominado de peroxidação lipídica ou, mais propriamente, de lipoperoxidação, que altera a estrutura e o comportamento da membrana, com perda da

permeabilidade seletiva a íons [CHIU, KUYPERS e LUBIN, 1989; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; KATO *et al*., 1990; RIKANS e HORNBROOK, 1997]. Isso ocorre não somente na membrana plasmática, mas também na membrana de organelas celulares, com a liberação de enzimas hidrolíticas dos lisossomos e a formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído, culminando com a morte celular [MELLO FILHO, HOFFMAN e MENEGHINI, 1983; HERSHKO, 1989].

A peroxidação lipídica teria também papéis importantes na determinação de doenças mutagênicas, devido a modificações em alguns aminoácidos como triptofano, cisteína, histidina e tirosina, responsáveis pela formação de algumas proteínas [ROVER *et al.*, 2001], na exacerbação do efeito de xenobióticos [SHAN, AW e JONES, 1990] e especialmente na diminuição da fluidez de membranas observada com o aumento da idade em animais experimentais [CHEN e YU, 1994].

ESTRUTURA, COMPOSIÇÃO E FLUIDEZ DAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

As membranas biológicas estão entre as maiores e mais complexas estruturas celulares. Muitas reações bioquímicas importantes acontecem ali. Elas criam uma barreira delimitando as células e, com isto, separam o meio extracelular do intracelular. Em células eucarióticas, elas formam estruturas intracelulares chamadas de organelas, que apresentam diferentes especializações funcionais. A membrana é o principal responsável pelo controle da entrada e saída de substâncias da célula e pela manutenção da constância do meio intracelular, que é diferente do meio extracelular. Por ter receptores específicos, tem a capacidade de reconhecer outras células e diversos tipos de moléculas, como, por exemplo, os hormônios. Algumas células se prendem firmemente umas às outras, formando camadas que delimitam compartimentos diferentes, através de suas membranas (um exemplo é o tecido epitelial que recobre o tubo digestivo). Em muitos tecidos, as membranas celulares apresentam moléculas que se ligam a componentes da matriz extracelular, participando tanto da fixação da célula em determinados locais, como da sua

migração no interior do tecido [ALBERTS *et al.*, 1994; HORTON *et al.*, 1996; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000].

Uma membrana biológica é constituída por uma bicamada contínua, com cerca de 5 nm de espessura, composta por fosfolipídeos, colesterol e proteínas. As monocamadas que formam aquela bicamada têm suas porções apolares localizadas internamente e suas porções polares expostas ao meio externo e interno da organela ou célula. Os carboidratos aparecem também nas estruturas de membranas, sob a forma de glicoconjugados com lipídeos e proteínas [DANIELLI e DAVSON, 1935].

A proporção de lipídeos e proteínas varia de acordo com as funções específicas da membrana. As moléculas de lipídeos constituem cerca de 50% da massa da maioria das membranas de células animais. A membrana plasmática de um eritrócito possui cerca de 20 tipos diferentes de proteínas, as quais desempenham inúmeras funções, dentre elas, transporte de diferentes solutos [STORRY, 2004].

Os lipídeos encontram-se unidos entre si e às proteínas por meio da força atrativa de van der Waals.

Para exercer adequadamente suas funções, as membranas não podem ser sólidas nem líquidas, mas fluidas. Essa fluidez é determinada pela sua composição. Uma maior quantidade de ácidos graxos insaturados [SINGER e NICHOLSON, 1972; CRIBIER, MORROT e ZACHOWSKI, 1993] nos fosfolipídeos aumentará a fluidez, uma vez que a presença de dobramentos da cadeia na configuração espacial *cis*, presente em insaturações de ocorrência natural, minimiza a magnitude das atrações intermoleculares de van der Waals e, por conseqüência, a temperatura de fusão da membrana. Por outro lado, quanto maior for a quantidade de ácidos graxos saturados nos fosfolipídeos da membrana, maior será sua rigidez [COOPER, 1978; HANSS e KOUTSOURIS, 1985; VAN BLITTERSWIJK, VAN DER MEER e HILMAN, 1987]. O sistema rígido de anéis fundidos do colesterol também aumenta a rigidez da membrana [GARZETTI *et al.*, 2001].

MECANISMOS DE DEFESA E REPARO DOS DANOS OXIDATIVOS

A produção contínua de ROM exige a ação de mecanismos antioxidantes e de reparação dos danos produzidos [HALLIWELL e GUTERIDGE, 1989; DIPLOCH, 1991; GOODE e WEBSTER, 1993; PACKER, 1997] para evitar a geração do estado de estresse oxidativo [CHOW, 1991].

Em relação à origem ou localização, os antioxidantes podem ser classificados em 1) dietéticos (como zinco, selênio, ácido ascórbico, α-tocoferol e carotenóides), 2) intracelulares (como glutation-peroxidase, superóxido-dismutase, ácido úrico, coenzima Q e catalase) e 3) extracelulares (como albumina, bilirrubina, ceruloplasmina, ferritina, mioglobina, metalotioneína e haptoglobina) [JACOB, 1985].

Em relação ao mecanismo de ação, eles são classificados em: 1) antioxidantes de prevenção (quando impedem a formação de radicais livres) como o zinco, selênio, albumina, bilirrubina, ceruloplasmina, ferritina, mioglobina, metalotioneína, glutationa peroxidase, superóxido dismutase, ácido úrico, coenzima Q, catalases; 2) varredores (quando impedem o ataque de radicais livres às células) como ácido ascórbico, α-tocoferal, carotenóides; e 3) de reparo (quando favorecem a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas) como as metaloenzimas dependentes de zinco [JACOB, 1985; KOURY e DONANGELO, 2003].

A dieta tem um papel importante sobre o efeito dos radicais livres no organismo que, entretanto, varia consideravelmente em função do tipo de organismo, da idade e do estado patofisiológico do indivíduo. A manifestação da toxicidade de oxigênio depende da presença e dos níveis na dieta de zinco, selênio, ácido ascórbico, α-tocoferol, carotenóides e também de ω3-PUFA (ácidos graxos polinsaturados da família ômega-3) [KAY *et al.*,1986; MACHILIN e BENDICH, 1987; SAHYOUN, JACQUES e RUSSEL, 1996].

Diferentemente dos ácidos graxos saturados, que podem ser sintetizados pelos animais a partir de carboidratos e aminoácidos [CALDER, 1996; MILES e CALDER, 1998], dois dos ácidos graxos insaturados, o linoléico (da família ω6) e o α-linolênico (da família ω3), não podem ser sintetizados pelos animais, por serem desprovidos das dessaturases específicas que permitem sua síntese

[SPRECHER *et al*., 1995]. Eles são, por isso, ácidos graxos essenciais na dieta desses animais.

Esses ácidos graxos insaturados são usados para 1) manutenção da estrutura e das funções das membranas biológicas, 2) biossíntese de eicosanóides, e 3) geração e armazenamento de energia [HAJRI e ABUMRAD, 2002].

Sua utilização na manutenção da estrutura e função de membranas biológicas é importante na transdução de sinais hormonais da insulina e nos mecanismos de comunicação envolvidos nas funções do sistema neural [BENATTI *et al*., 2004].

O ácido linoléico é precursor da biossíntese dos eicosanóides do grupo 1 e de ácido araquidônico, outro ácido graxo insaturado, precursor da biossíntese dos eicosanóides do grupo 2. O ácido α-linolênico é precursor da biossíntese de vários outros ácidos graxos insaturados da família ω3 e dos eicosanóides do grupo 3. Os eicosanóides são importantes na deflagração da resposta inflamatória e da resposta imune, dentre outros processos. Esses mecanismos são importantes para proteção contra infecção, mas em longo prazo determinam doenças inflamatórias e auto-imunes. Os eicosanóides produzidos a partir dos ω3-PUFA são muito importantes na modulação das respostas inflamatória e imune, razão pela qual eles seriam importantes para prevenção da aterosclerose, de vários tipos de câncer (mama, próstata e cólon, por exemplo), da artrite reumatóide e de doenças autoimunes, como a esclerose múltipla [CONNOR, 2000; JUMP, 2002].

Um equilíbrio na ingestão de ácidos graxos das famílias ω6 e ω3 deve atender aos propósitos estruturais e às necessidades modulatórias das respostas inflamatória e imune [BENATTI *et al*., 2004]. Várias evidências sugerem que uma razão de ω6:ω3 de 5:1 na dieta seria a mais adequada [SANT'ANA, 2004], embora a questão seja ainda muito controversa.

Numa dieta equilibrada, a geração e armazenamento de energia a partir dos ω3-PUFA deve ter uma importância modesta. O ω3-PUFA armazenados nas membranas das células são mais significativos para desencadear a biossíntese de eicosanóides vinculada a estímulos inflamatórios e imunológicos.

OS ERITRÓCITOS COMO MODELO DE ESTUDO

Os eritrócitos são considerados como bons modelos para o estudo das membranas biológicas, especialmente de sua estabilidade, uma vez que a hemólise provocada por qualquer fator de estresse ambiental, libera hemoglobina, que pode ser quantificada pela leitura espectrofotométrica da absorbância em 540 nm. A A_{540nm} é proporcional à extensão da lise dos eritrócitos (hemólise).

Além da hemoglobina, os outros componentes solúveis do eritrócito, como suas enzimas, também podem ser dosadas, o que exige a separação dos elementos figurados íntegros do sangue e dos debris celulares, o que pode ser convenientemente executado por centrifugação [MOECKEL *et al.*, 2002; NELSON e COX, 2005].

Os eritrócitos fornecem um modelo único para avaliar o mecanismo do envelhecimento celular, tanto ao nível de função celular como do envelhecimento do indivíduo. Estudos dos eritrócitos em jovens levaram à elaboração de hipóteses sobre o mecanismo envolvido na geração de sinais de senescência e a remoção de eritrócitos envelhecidos pelos macrófagos esplênicos [CAPRARI *et al*., 1999].

As principais mudanças observadas em eritrócitos senescentes incluem alterações em glicoproteínas [AMINOFF, 1988], diminuição da simetria fosfolipídica [MCEVOY, WILLIAMSON e SCHLEGEL, 1986] e modificações nas proteínas de membrana com o aparecimento de antígenos senescentes de superfície [KAY *et al*., 1984].

A ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS

A fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) pode ser definida como a resistência dos eritrócitos à hemólise contra soluções de 0 a 0,9 g/dL de NaCl em água destilada [JAIN, 1986]. O controle do volume celular pela eliminação ativa de solutos é um dos mecanismos pelo qual a lise da membrana eritrocitária é evitada *in vivo* [MAKINDE e BOBADE, 1994]. As células, quando suspensas em meio

hipotônico, aumentam até atingir um volume crítico de hemólise antes de serem lisadas.

Diversos fatores, como a composição, a forma, o volume, a natureza e a concentração de hemoglobina, podem afetar a fragilidade dos eritrócitos, principalmente por diferenças na viscoelasticidade de suas membranas. As células menores apresentam capacidade limitada de expansão e, por isso, atingem o volume hemolítico crítico mais precocemente. O tempo de vida do eritrócito é outro fator importante. Os eritrócitos com maior tempo de vida, que correspondem a aproximadamente a 30% da população eritrocitária, são mais frágeis que os mais jovens [WEED e REED, 1966; COOPER, 1975; SASAKI, 1977; TELEN e KAUFMAN, 1999].

A estabilidade de eritrócitos contra estresse hipotônico (fragilidade osmótica) é rotineiramente usada para diagnósticos de hemoglobinopatias, principalmente esferocitoses, e na avaliação do efeito de drogas sobre a hematopoiese [PARPART, LORENZ e PARPART, 1947; SUESS, LIMENTANI e DAMESHESK, 1978; SIRICHOTIYAKUL *et al*., 2004], mas têm sido também utilizada para identificar alterações de membrana em portadores de câncer cervical, de apnéia obstrutiva do sono [OZTÜRK *et al*., 2003] e em diversas outras situações [RIFKIND; ARAKI e HADLEY, 1983; ORCUTT, THURMOND e FERSLEW, 1995; ALDRICH e SAUNDERS, 2001; GU, SMITH e CHARTZIMAVROUDIS, 2005].

EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS

A dependência térmica das células é usada em práticas de esterilização, tratamento de câncer e purificação de linhagens de células, mas também em estudos sobre adaptação térmica e hibernação, dentre outros.

A dependência térmica de eritrócitos tem sido usada em estudos sobre a relação entre estrutura e função de complexos biológicos e também sobre a ação de drogas.

A resistência celular ao calor é diminuída pela ação de radiações ionizantes, pressões elevadas, solventes orgânicos [WEBER e BONT, 1996], anestésicos [YATVIN *et al*., 1982], agentes desnaturantes [ALEXANDROV, 1979] e altos

níveis de cálcio no meio extracelular [STEGE *et al*., 1993]. Mas é aumentada pela ação de osmólitos [BACK, OAKENFULL e SMITH, 1979; GORDON, 1953; SANTORO *et al*., 1992], alguns cátions divalentes [LI, FISHER e HAHN, 1982], pressão suave [ALEXANDROV, 1979] e algumas drogas anti-inflamatórias [KATO *et al*., 1990].

Os lipídeos e proteínas das membranas biológicas são muito importantes na adaptação da célula a mudanças na temperatura. A resistência térmica de bactérias termofílicas depende da presença de ácidos graxos saturados de cadeia longa nos seus fosfolipídeos de membrana, pois eles permitem que a membrana mantenha a fluidez necessária para o exercício de suas funções [RUSSEL e FUKUNAGA, 1990].

A fluidez de uma membrana pode ser alterada em função da temperatura. O abaixamento da temperatura leva a membrana a sofrer uma diminuição reversível de fluidez. Existe um valor de temperatura, que depende da natureza dos ácidos graxos dos fosfolipídeos da membrana, em que a membrana passa do estado fluídico para o estado não-fluídico com a diminuição da temperatura e vice-versa com o aumento da temperatura. Esse valor de temperatura é denominado de temperatura de transição de fusão da membrana. Membranas com fosfolipídeos mais ricos em ácidos graxos insaturados (UFA) possuem uma temperatura de transição de fusão mais baixa do que aquelas com fosfolipídeos mais ricos em ácidos graxos saturados (SFA).

A própria bactéria pode alterar a composição em ácidos graxos de seus fosfolipídeos de membrana, conforme a temperatura do ambiente em que crescem. Quando a bactéria cresce em baixas temperaturas, suas membranas apresentam um teor mais elevado em ácidos graxos insaturados do que apresentam se crescem em temperaturas mais elevadas. Essa alteração na composição é um mecanismo que a bactéria usa para manter a fluidez de suas membranas, mesmo com flutuações na temperatura [MARR e INGRAHAN, 1962; CRONAN e GELMANN, 1973; DE MENDOZA e CRONAN, 1983; VIGH, MARESCA e HARWOOD, 1998; KLEIN, WEBER e MARAHIEL, 1999; MANSILLA *et al*., 2004].

A resistência térmica de eritrócitos humanos também depende da composição e natureza de seus fosfolipídeos, bem como do teor de colesterol da

membrana. Em eritrócitos humanos, a resistência térmica foi também atribuída à presença de esfingomielina [RUSSELL e FUKUNAGA, 1990]. Mas os eritrócitos não apresentam atividade lipogênica para permitir alterações na composição de sua membrana, que é largamente dependente da alimentação e da lipogênese hepática.

INFLUÊNCIA DA IDADE DAS VOLUNTÁRIAS NOS ERITRÓCITOS

A influência da idade do doador nos eritrócitos tem sido analisada em relação aos valores de hematócrito [GERSHON e GERSHON, 1988; KOSOWER, 1993], quantidade de hemoglobina [ZAUBER e ZAUBER, 1987; FRASER *et al*., 1989; WILLIAMS, 1995], tempo de vida [GERSHON e GERSHON, 1988; KOSOWER, 1993], ligação de imunoglobulinas [GERSHON e GERSHON, 1988; KOSOWER, 1993], reciclagem [WILLIAMS, 1995], composição e comportamento de membrana [RIFKIND *et al*., 1983; PRISCO *et al*., 1991; BECKMAN *et al*., 1998; RABINI *et al*., 2002].

O envelhecimento leva a alteração na composição em fosfolipídeos e no padrão de assimetria da membrana de eritrócitos [RIFKIND, ARAKI e HADLEY, 1983], o que sabidamente pode afetar as propriedades elétricas da membrana e o equilíbrio entre a célula e o meio [MUTUS *et al*., 2000]. O teor de ácidos graxos insaturados diminui [PRISCO *et al*., 1991; BECKMAN e AMES, 1998] e o de ácidos graxos saturados aumenta com a idade [PRISCO *et al*., 1991].

Isso faz muito sentido em relação à teoria oxidativa, especialmente porque os eritrócitos, devido ao seu alto conteúdo de Fe^{+2}, presente na hemoglobina, são muito vulneráveis à formação de ROM [CHIU, KUYPERS e LUBIN, 1989], que podem reagir com proteínas [TUMA *et al*., 1984; TUMA *et al*., 1987] e ácidos graxos polinsaturados de membrana [GUTTERIDGE, 1993; WISEMAN, 1996; BECKMAN e AMES, 1998].

Entretanto, os centenários apresentam eritrócitos com um teor de ácidos graxos insaturados maior do que os idosos mais jovens, embora a suscetibilidade à lipoperoxidação das membranas de seus eritrócitos tenha sido menor em relação a eles [RABINI *et al*., 2002]. Mas isso poderia ser explicado pela maior

defesa antioxidante observada nas membranas de centenários em comparação com pessoas de outras idades [PAOLISSO, 1998].

A preservação da composição e comportamento de suas membranas talvez seja uma das razões da maior longevidade dos centenários. Essa composição foi também desejável quanto à razão ω6-PUFA:ω3-PUFA, pois os fosfolipídeos da membrana dos eritrócitos dos centenários tinham um menor teor de ácido linoléico e de ácido araquidônico (ω6-PUFA) e um maior teor de ácido eicosapentaenóico e de ácido docosahexaenóico (ω3-PUFA) em comparação aos indivíduos mais velhos não-centenários [RABINI *et al*., 2002].

É importante lembrar que o eritrócito nestes estudos está sendo usado como modelo da composição e comportamento de membranas biológicas. Sem dúvida, o que está ocorrendo com o eritrócito, deve também ser válido para a composição e comportamento de outras membranas. A menor razão ω6-PUFA:ω3-PUFA previne a deterioração do comportamento da membrana sináptica [URANO *et al*., 1998] e das membranas dos miócitos do coração [BIAGI *et al*., 1999], porque um maior teor de ω-6 PUFA não apenas proporcionaria um aumento na peroxidação e na rigidez da membrana mas também influencia no metabolismo de eicosanóides e citocinas [WANDER *et al*., 1997].

Muitos outros fatores devem estar envolvidos na relação entre a longevidade dos centenários e o binômio estrutura-comportamento da membrana de seus eritrócitos e outras células. Esses fatores podem compreender o alto teor de ácido siálico na membrana, o que poderia diminuir a tendência à agregação de plaquetas [MAZZANTI *et al*., 2000] induzida pela homocisteína via óxido nítrico [MUTUS *et al*., 2000].

A IMPORTÂNCIA DA NUTRIÇÃO

As membranas biológicas são responsáveis não somente por delimitar e definir as organelas e células, mas também por manter a comunicação entre as células e o organismo como um todo. A sua composição depende da nutrição, principalmente nos teores de ácidos graxos polinsaturados que são essenciais [WISEMAN, 1996].

A nutrição é um fator importante na determinação da saúde e da capacidade funcional do indivíduo. O estado nutricional expressa o grau em que as necessidades nutricionais estão sendo atendidas, para manter a composição e funções do organismo [JEEJEEBHOY, DETSKY e BAKER, 1990]. Ele tem um alto impacto no bem estar físico e psicológico, especialmente em idosos.

Os idosos têm um maior risco de apresentar desnutrição e degeneração de seu estado de saúde [VETTA *et al*., 1999; SAMPAIO, 2004], seja pela deficiência alimentar, em função da falta de recursos financeiros [BRIEFEL e WOTECKI, 1992; OLIVIERI *et al*., 1994; OMRAN e MORLEY, 2000; PIRLICH e LOCHS, 2001] ou pela má absorção, em função da alta freqüência de distúrbios gastrintestinais [VETTA *et al*., 1999].

Muitos fatores contribuem para a alta incidência de desnutrição na população idosa. Eles compreendem solidão, dentição pobre, diminuição da sensibilidade ao paladar e olfato, disfagia, depressão, abuso de substâncias (como a fluoxetina, usada no tratamento de depressão), deterioração cognitiva entre outros fatores [ARRUDA e ARRUDA, 1994; JACOB FILHO e SOUZA, 1994; DEVLIN, 2000], além da coexistência de múltiplas doenças, como a doença de Parkinson, a doença pulmonar obstrutiva crônica, acidentes cerebrovasculares, insuficiência cardíaca congestiva e insuficiência renal crônica [MCWHIRTER e PENNINGTON, 1994; DEVLIN, 2000].

A desnutrição representa um fator independente de risco de morbidade e mortalidade [BRIEFEL e WOTECKI, 1992]. Ela predispõe a uma série de complicações, como tendência a infecções, deficiência na cicatrização, falência respiratória, insuficiência cardíaca, diminuição da síntese de proteínas, diminuição na filtração glomerular e na produção de suco gástrico [JEEJEEBHOY, 1998; MCWHIRTER e PENNINGTON, 1994; SMITH e MULLEN, 1991]. Pacientes idosos desnutridos quando hospitalizados apresentam maior incidência de complicações e mortalidade em relação aos idosos bem nutridos [COVINSKI, MARTIN e BEYTH, 1999].

Por outro lado, o sobrepeso [Índice de massa corporal entre 25,0 e 30,0 (de acordo com a Organização Mundial de Saúde)] e principalmente a obesidade (Índice de massa corporal acima de 30,0) são fatores de risco para várias complicações como doença isquêmica do coração, hipertensão arterial, acidente

vascular cerebral, diabetes mellitus do tipo 2, colelitíase, osteoartrite e esofagite de refluxo [STALLINGS e HARK, 1996; DEHOOG, 1998; OMRAN e MORLEY, 2000; PIRLICH e LOCHS, 2001].

A avaliação nutricional do idoso é dificultada pelo fato da maioria dos valores de referência dos indicadores do estado nutricional ser relativa a adultos jovens, que não expressam necessariamente a normalidade no idoso [SAMPAIO, 2004].

A necessidade de ter instrumentos simples e rápidos para avaliação do estado nutricional do idoso levou à elaboração do MNA (Mini Avaliação Nutricional), que engloba análises 1) antropométrica, 2) dietética, 3) clínica global e 4) auto-perceptiva dos estados de nutrição e saúde [GUIGOZ, VELLAS e GARRY, 1994; GUIGOZ, VELLAS e GARRY, 1996; VELLAS et. al., 1999; GUIGOZ, LAUQUE e VELLAS, 2002; BLEDA *et al*., 2002; DONINI *et al*., 2003]. O MAN apresenta 98% de sensibilidade, 100% de especificidade e 99% de exatidão no diagnóstico do estado nutricional de indivíduos idosos relativamente saudáveis [RUBENSTEIN *et al*., 2001]. Ele tem sido muito utilizado no diagnóstico do estado nutricional de idosos que inspiram cuidados por períodos prolongados [SALETTI *et al*., 2000; RUBENSTEIN *et al*., 2001; GUIGOZ, LAUQUE e VELLAS, 2002; SAAVA e KISPER-HINT, 2002; THOMAZ *et al*., 2002; DONINI *et al*., 2003; HUDGENS *et al*., 2004; ALVES DE RESENDE *et al*., 2005].

Entretanto, o MNA e nenhum outro instrumento de avaliação nutricional não são capazes de identificar deficiências seletivas de nutrientes. Indivíduos aparentemente saudáveis podem apresentar deficiências seletivas que produzirão anomalias celulares a médio ou longo prazo. A falha na identificação e tratamento de uma desnutrição seletiva é considerada um dos grandes problemas da prática clínica [ELIA, ZELLIPOUR e STRATTON, 2005).

A deficiência de ω3-PUFA é um exemplo de deficiência seletiva cuja correção seria capaz de modificar o prognóstico de diversas doenças, como aterosclerose e diabetes do tipo 2 [CONNOR, 2000; BENATTI *et al*., 2004].

A investigação de carências nutricionais específicas deveria ser parte da avaliação nutricional de qualquer indivíduo desde a infância até a maturidade, pois seguramente teria um grande impacto positivo na saúde e longevidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O envelhecimento envolve alterações estruturais e funcionais dos complexos organizacionais biológicos, particularmente das membranas, como as membranas dos eritrócitos, cujas alterações com o envelhecimento devem refletir as mudanças que estão ocorrendo também em outras membranas do organismo. Entretanto, a composição, estrutura e comportamento de uma membrana biológica dependem da herança genética, da alimentação [DOUGHERTY *et al*., 1987; OLIVIERI *et al*., 1994], do estilo de vida e da degeneração estocástica [JOZWIAK e JASNOWSKA, 1985; ONARAM, YALÇIN e SULTUYBEK, 1997]. O estudo dos efeitos da degeneração crônica de membrana exige o controle das demais variáveis para evitar os resultados contraditórios que têm sido reportados para lipoperoxidação de membranas [ONARAN, YALÇIN e SULTUYBEK, 1997; GÜVEN *et al*., 1999; ÖZAYDIN *et al*., 2001]. É possível que as características bioquímicas e o comportamento de membrana, sejam bons indicadores da idade biológica de um indivíduo.

CAPÍTULO 2

TRABALHO EXPERIMENTAL

INFLUÊNCIA DA IDADE DE DOADORAS HUMANAS SOBRE A ESTABILIDADE DE SEUS ERITRÓCITOS

RESUMO

[**Título**] Influência da idade de doadoras humanas sobre a estabilidade de seus eritrócitos. [**Introdução**] A estabilidade de uma membrana biológica é resultante de sua composição e da composição do meio interno do organismo vivo, que dependem de influências genéticas, alimentação e estilo de vida. [**Objetivo**] Este trabalho teve por objetivo estudar transversalmente em uma amostra da população feminina a dependência da estabilidade de eritrócitos humanos com a idade, o estado nutricional, a quantidade de eritrócitos e o volume corpuscular médio (VCM). [**Amostra**] A amostra foi constituída de mulheres com 20 a 94 anos, provenientes de uma região definida com hábitos alimentares e estilos de vida semelhantes. [**Métodos**] A estabilidade de eritrócitos, contra lise por choque hipotônico e a ação de etanol, foi dada pela concentração de NaCl (H_{50}) ou de etanol (D_{50}) capaz de promover 50% de hemólise. Os valores de H_{50} foram determinados a 26, 32, 37, 42 e 47 °C, e os de D_{50}, apenas a 37 °C. O estado nutricional das voluntárias foi avaliado pela Mini-Avaliação Nutricional (MNA). [**Resultados**] H_{50} foi inversamente dependente ($P<0.05$) da idade, mas não com o escore do MNA, o VCM e a contagem de eritrócitos das voluntárias, a 26, 32, 37 e 42 °C, mas não a 47 °C. D_{50} apresentou uma dependência linear positiva com a idade. H_{50} apresentou uma dependência linear negativa com o aumento da temperatura. Os valores de H_{50} na reta de dependência térmica de H_{50} das mulheres com 20 a 39 anos foram significantemente maiores daqueles da reta das mulheres acima de 60 anos. [**Conclusões**] A estabilidade dos eritrócitos contra estresse hipotônico e desnaturação por etanol aumentou com a idade de suas doadoras. Este aumento na estabilidade de eritrócitos não foi determinado por diferenças no estado nutricional e nem por diferenças no volume corpuscular médio. A estabilidade dos eritrócitos das voluntárias diminuiu significantemente com o aumento na temperatura entre 26 e 47 °C. As mulheres com mais de 60 anos apresentaram eritrócitos com maior estabilidade do que aquelas com 20 a 39 anos nesse intervalo térmico.

DESCRITORES: Envelhecimento, estabilidade de eritrócitos, estabilidade de membranas, mini-avaliação nutricional, temperatura.

ABSTRACT

[**Title**] **Influence of the age on the stability of human erythrocytes**. [**Introduction**] The stability of a biological membrane is resultant from its composition and from the composition of the internal medium of the living organism, which depends on genetic influences, feeding and life style. [**Objective**] This work aimed to study transversally in a human female population the dependence of the erythrocytes stability with age, nutritional status, erythrocytes counting and medium corpuscular volume (MCV). [**Subjects**] The sample was constituted of human females (N = 67), with 20 to 94 years, proceeding from a defined region with similar dietary habits and life styles. [**Methods**] The erythrocytes stability against hypotonic lysis and ethanol action was given by the concentration of NaCl (H_{50}) or ethanol (D_{50}) capable to promote 50% of hemolysis. The H_{50} values were determined at 26, 32, 37, 42 and 47 °C; the D_{50} values were determined only at 37 °C. The nutritional status of the volunteers was evaluated with the Mini-Nutritional Assessment (MNA). [**Results**] H_{50} was inversely dependent ($P<0.05$) with age and MCV, but not with MNA score neither the erythrocyte counting of the volunteer, at 26, 32, 37 and 42 °C, but not at 47 °C. D_{50} presented a linear and positive dependency with the volunteer age. H_{50} present a linear and negative dependence with the temperature increase. The H_{50} values in the thermal dependence line of H_{50} for the females with 20 to 39 years were significantly higher than those for the females above 60 years. [**Conclusions**] The stability of the erythrocytes against hypotonic stress and denaturation by ethanol increased with the age of the volunteers. This stability increase was not determined by differences in the nutritional status neither in medium corpuscular volume. The stability of the erythrocytes decreased significantly with the temperature increase between 26 and 47 °C. The females above 60 years presented erythrocytes with higher stability than the females with 20 to 39 years within this thermal interval.

KEYWORDS: Aging, erythrocyte stability, membrane stability, Mini Nutritional Assessment, temperature.

INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo complexo que resulta de herança genética e do modo como os indivíduos estabelecem seus hábitos alimentares e seus estilos de vida. Ele está associado a alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e energéticas, que incluem alterações nas membranas de células e organelas.

Um modelo muito bom para estudar a composição e o comportamento das membranas biológicas naturais é o eritrócito, uma vez que sua lise libera a proteína hemoglobina que pode ser facilmente detectada por avaliação espectroscópica da extinção de luz em 540 nm.

O envelhecimento tem sido associado a alterações nos índices de hematócrito [GERSHON e GERSHON, 1988; KOSOWER, 1993], níveis de hemoglobina [FRASER *et al*., 1989; WILLIAMS, 1995], e meia-vida [GERSHON e GERSHON, 1988; KOSOWER, 1993], reciclagem [WILLIAMS, 1995], e composição da membrana [PRISCO *et al*., 1991] de eritrócitos humanos.

Em um estudo com 81 humanos saudáveis, foi descrito um aumento idade-dependente da proporção de ácidos graxos saturados em relação aos ácidos graxos insaturados nos fosfolipídeos da membrana de seus eritrócitos [PRISCO *et al*., 1991]. Esta alteração poderia ser determinante da rigidificação de membrana atribuída ao processo de envelhecimento [HOCMAN, 1979; MARIN *et al*., 1990], uma vez que alterações observadas no comportamento da membrana devem estar associadas a mudanças em sua composição ou estrutura [ARAKI e RIFKIND, 1981; IVANOV, 1999].

Em um paradoxo aparente, indivíduos centenários apresentaram uma maior proporção de ácidos graxos insaturados (UFA) em relação aos ácidos graxos saturados (SFA) nas membranas de seus eritrócitos e, consequentemente, uma maior fluidez de membrana, em relação aos idosos mais velhos não-centenários [CAPRARI *et al*., 1999; RABINI *et al*., 2002].

Esse paradoxo pode ser facilmente resolvido se nós considerarmos que os centenários ocupam uma região nas curvas de sobrevivência onde a mortalidade perde força e desacelera, o que significa que o que ocorre com a membrana dos eritrócitos de centenários pode não se aplicar à população em geral.

Para compreender as regras que governam as mudanças nas membranas biológicas com o envelhecimento, é conveniente separar a população geral, que na melhor das hipóteses irá atingir idade em torno da longevidade média, dos centenários, que têm fatores genéticos, nutricionais e comportamentais que seguramente os estão predestinando a atingir idades próximas à longevidade máxima da espécie humana.

Trabalhar com populações não-homogêneas em relação a esses fatores genéticos, nutricionais e comportamentais, deve ser a causa de confusão na interpretação do comportamento e composição de membranas.

Seguramente, a estabilidade de uma membrana biológica é uma função de sua composição. Mais simples do que estudar a composição da membrana dos eritrócitos é estudar sua estabilidade. A estabilidade de eritrócitos é geralmente estudada contra choque hipotônico (fragilidade osmótica). Infelizmente, a relação entre estabilidade de eritrócitos e a idade tem produzido resultados que não expressam um padrão inequívoco, e resultados conflitantes tendo sido reportados [FERNANDEZ-ALBERTI e FINK, 2000].

Vários efeitos do envelhecimento podem resultar de mudanças físico-químicas nas membranas das células. Este ponto de vista constitui o que pode ser chamada de paradigma físico-químico do envelhecimento, onde pode ser inserida a questão da mudança na estabilidade de membrana com o aumento da idade. Sendo assim, é possível que características bioquímicas e o comportamento de membranas sejam indicadores da idade biológica de um indivíduo.

Neste trabalho, nós nos debruçamos sobre este paradigma, investigando a influência da idade sobre a estabilidade de eritrócitos de doadoras voluntárias da cidade brasileira de Uberlândia, onde a pirâmide nutricional é pobre em fontes de ácidos graxos insaturados.

Para obter resultados que expressassem tendências inequívocas em relação a idade dessa população, a estabilidade dos eritrócitos foi investigada contra choque hipotônico em diversas temperaturas (26, 32, 37, 42 e 47 °C) e contra etanol a 37 °C, e foi aqui expressa como a concentração de NaCl (H_{50}) ou de etanol (D_{50}) capaz de causar 50% de hemólise.

Desde que a composição de nossas membranas é um reflexo de nossa nutrição e a desnutrição é uma tendência comum na velhice [ALVES DE REZENDE *et al*., 2005], nós também investigamos o estado nutricional geral de nossas voluntárias, usando o instrumento designado na literatura como Mini Nutritional Assessment (MNA), que em português significa Mini-Avaliação Nutricional. O MNA é um instrumento inicialmente desenvolvido para avaliar o estado nutricional na velhice [GUIGOZ, VELLAS e GARRY, 1994; VELLAS *et al*., 1999; BLEDA *et al*., 2002; DONINI *et al*., 2003] que apresenta 98% de sensibilidade, 100% de especificidade e 99% exatidão no diagnóstico da desnutrição [RUBENSTEIN *et al*., 2001].

Como alterações na estabilidade da membrana dos eritrócitos também poderiam estar relacionadas com alterações na contagem, forma e dimensão dessas células, nós também avaliamos a contagem e o volume corpuscular médio (VCM) dos eritrócitos das voluntárias.

O trabalho descreve, interpreta e analisa no contexto da literatura corrente em Biogerontologia os resultados obtidos das análises de correlação e regressão entre os parâmetros considerados.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

As medidas de massa foram feitas em uma balança digital de precisão da marca AND, modelo 870. As determinações de volume foram feitas em buretas de vidro refratário ou com pipetas automáticas (Labsystems). As incubações em temperaturas definidas foram feitas em banho termostatizado (Marconi, modelo MA 184, Piracicaba, SP, Brasil). As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro de feixe único (Micronal, modelo B-442, São Paulo, SP, Brasil).

As amostras de sangue (5 mL) de doadores voluntários (entre 20 e 95 anos de idade) saudáveis em jejum de 8 a 12 horas foram coletadas por punção da veia cefálica ou basílica em tubos evacuados contendo K_4EDTA a 1 $g.dL^{-1}$.

As determinações dos glóbulos vermelhos (RBC), hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), foram realizadas em um contador de células da marca Celm, modelo CC530/550.

O cloreto de sódio utilizado para os experimentos de fragilidade osmótica foi adquirido da Chemco com grau de pureza de 99% e utilizado sem purificação adicional.

Amostra

Este estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Uberlândia. Ele também foi devidamente autorizado por cada paciente do gênero feminino recrutada entre 104 voluntárias (67 para teste de estresse hipotônico e 37 para determinação da estabilidade de eritrócitos contra etanol), aparentemente saudáveis, não fumantes, não consumidoras de bebidas alcoólicas e sem uso de medicação (com exceção de anti-hipertensivos), que espontaneamente se apresentaram como voluntárias neste estudo.

Avaliação do estado nutricional

O processo de avaliação nutricional tem dois componentes, a seleção e a avaliação [BARROCAS, 2000; DEHOOG, 1998]. Nesse trabalho, o estado nutricional de cada voluntário foi avaliado pelo uso do instrumento Mini-Nutritional

Assessment (MNA), que em língua portuguesa significa Mini-Avaliação Nutricional (**Anexo**).

O MNA é constituído por 18 itens, distribuídos em quatro diferentes categorias de avaliações: 1) antropométrica (perda de peso nos últimos três meses, índice de massa corporal, circunferência do braço e da panturrilha); 2) global (mobilidade, doenças agudas, problemas neurofisiológicos, medicação e ocorrências de lesões da pele); 3) dietética (qualidade e quantidade de alimentos e ingestão de líquidos e autonomia na alimentação); e 4) pessoal (auto-avaliação dos estados de saúde e de nutrição) [GUIGOZ, VELLAS e GARRY, 1994; GUIGOZ, VELLAS e GARRY, 1996; GUIGOZ, LAUQUE e VELLAS, 2002).

As avaliações antropométricas constituem os itens 1 a 4 do MNA.

O Índice da Massa Corporal (IMC) foi determinado de acordo com a equação:

$$\mathrm{IMC} = \frac{m}{h^2} \qquad (2.1),$$

onde m é a massa corporal, dada em kg, e h é a altura, dada em metros. As voluntárias foram pesadas com roupas leves e sem sapatos, em uma balança antropométrica de braço, com capacidade para 150 kg. A altura foi medida com a voluntária descalça, com os pés juntos, os calcanhares contra o estatiômetro da balança, o corpo ereto, sem inclinação da cabeça, com o olhar no horizonte, de forma que a linha que passa na parte superior da orelha até o canto externo do olho ficasse paralela ao solo. O estatiômetro foi abaixado até que sua haste horizontal superior ficasse plana, apoiada na parte superior da cabeça. Nesta postura, foi realizada a medida do comprimento de cada voluntária [NAJAS e SACHS, 1996; DEHOOG, 1998; BARROCAS, 2000; WAITZBERG e FERRINI, 2000].

A Circunferência do Meio do Braço (CMB) forneceu uma estimativa da massa muscular esquelética [FRISANCHO, 1988; DORMENVAL, MOJON e BUDTZ-JÖRGENSEN, 1999; BUDTZ-JÖRGENSEN, CHUNG e MOJON, 2000]. Para obtê-la, o braço foi medido clinicamente com uma fita métrica não-extensível, da extremidade do processo acrômio da escápula ao processo olecrânio da ulna. A CMB foi medida no ponto médio desta distância, usando o

braço não-dominante da voluntária como padrão [DEHOOG, 1998; DORMENVAL, MOJON e BUDTZ-JÖRGENSEN, 1999; WAITZBERG e FERRINI, 2000].

A medida da Circunferência da Panturrilha (CP), combinada a outras medidas, é um dado antropométrico adicional na obtenção de informações sobre a composição corporal [DEHOOG, 1998; BUDTZ-JÖRGENSEN, CHUNG e MOJON, 2000]. Com a paciente de pé, o ponto de maior convexidade da perna foi medido com uma fita métrica [WAITZBERG e FERRINI, 2000].

A avaliação global é constituída pelos itens 5 a 10 do MNA, que se referem ao estilo de vida, uso de medicação e mobilidade da paciente. As perguntas foram pontuadas de acordo com a avaliação individual.

A avaliação dietética é constituída pelos itens 11 a 16, que se referem à autonomia da alimentação, ao número de refeições diárias, os alimentos e as quantidades de líquidos ingeridos.

A avaliação pessoal (auto-avaliação) quanto ao estado de saúde e de nutrição é constituída pelos itens 17 e 18, que se referem à auto-percepção da paciente quanto ao seu estado nutricional e de saúde em comparação com outras pessoas da mesma idade.

As avaliações usadas na determinação dos escores do MNA foram executadas sempre por apenas um único pesquisador para evitar erros entre observadores. De acordo com seus escores no MNA (0-30), as voluntárias foram classificadas em desnutridas (≤ 17), em risco de desnutrição (17,5-23,5) e bem nutridas (≥ 24).

Avaliação da estabilidade dos eritrócitos contra choque hipotônico (fragilidade osmótica)

Os experimentos foram realizados em triplicata em tubos de ensaio. Os tubos receberam inicialmente 2 mL de NaCl em concentrações de 0 a 1 $g.dL^{-1}$, foram então fechados e pré-incubados por 10 minutos a 26, 32, 37, 42 ou 47°C. Após a pré-incubação, cada tubo era aberto, recebia 20 µL de sangue, era hermeticamente fechado, homogeneizado e incubado por 20 minutos à temperatura de cada ensaio. Em seguida, os tubos eram centrifugados a 1300x*g*

por 10 minutos na temperatura do ensaio e seus sobrenadantes eram analisados quanto à absorção de luz em 540 nm ($A_{540\ nm}$).

A taxa de hemólise foi expressa em porcentagem de hemólise da seguinte forma:

$$\text{Hemólise}\,(\%) = \frac{A}{A_{max.}} \times 100\% \qquad (2.2),$$

onde **A** representa a absorvância lida de cada sobrenadante e $\mathbf{A_{max}}$ representa a absorvância máxima da série, obtida a partir da linha de regressão sigmoidal da dependência de $\mathbf{A_{540}}$ contra a concentração de NaCl.

A dependência de porcentagem de hemólise com a concentração de NaCl foi ajustada a uma linha de regressão sigmoidal de acordo com a equação de Boltzmann:

$$\text{Hemólise}\,(\%) = \frac{A_{max} - A_{min}}{1 + e^{(S - H_{50})/dS}} \qquad (2.3),$$

onde $\mathbf{A_{max}}$ e $\mathbf{A_{min}}$ representam a porcentagem mínima e máxima de hemólise, **S** é a concentração de cloreto de sódio, $\mathbf{H_{50}}$ é a concentração de cloreto de sódio capaz de promover 50% de hemólise dos eritrócitos, e **dS** representa a amplitude da concentração de sal relacionada com a transição de hemólise por choque hipotônico.

Estabilidade de eritrócitos contra etanol

Uma série de tubos de ensaio com tampa (em triplicatas), contendo 2 mL de 0 a 16 $g.dl^{-1}$ etanol foi pré-incubada por 10 minutos a 37 °C. Após adição de 20 µL de sangue, homogeneização, fechamento e incubação por 20 minutos, os frascos foram centrifugados a 1300x*g* por 10 minutos à temperatura do ensaio. Os sobrenadantes foram individualmente submetidos a medidas de absorvância em 540 nm.

A percentagem de hemólise em cada tubo de ensaio foi calculada pelo uso da equação 2 e ajustada a linhas de regressão sigmoidal de acordo com a seguinte forma da equação de Boltzmann:

$$\text{Hemólise}\,(\%) = \frac{A_{min} - A_{max}}{1 + e^{(D - D_{50})/dD}} + A_{max} \qquad (2.4),$$

onde $\mathbf{A_{min}}$ e $\mathbf{A_{max}}$ representam as percentagens médias mínima e máxima de hemólise, respectivamente, **D** é a concentração de etanol, $\mathbf{D_{50}}$ é a concentração de etanol capaz de promover 50% de lise dos eritrócitos, e **dD** representa a amplitude da concentração de etanol relacionada com a transição de lise dos eritrócitos pelo caotrópico.

Contagem de eritrócitos e determinação do volume corpuscular médio (VCM)

As contagens de eritrócitos e determinações de VCM foram feitos em um contador de células da marca Celm, modelo CC530/550.

Cálculos, edição de dados e análises estatísticas

Os cálculos, as edições dos dados e as análises estatísticas foram executados com a utilização do aplicativo OriginPro 7.5 (Microcal Inc., Massachusetts, EUA). Os ajustes sigmoidais e lineares foram considerados significantes apenas quando os valores de P em cada ajuste eram menores que 0,05.

RESULTADOS

A **Tabela 2.1** apresenta os resultados da avaliação nutricional, feita pela utilização do MNA. Das 67 voluntárias, 76,1% se apresentaram bem nutridas, 23,9% em risco de desnutrição e nenhuma com desnutrição.

A **Figura 2.1** apresenta uma típica curva de fragilidade osmótica de uma voluntária. Ela mostra a linha de regressão sigmoidal que representa a dependência da percentagem de hemólise com a concentração de NaCl de uma voluntária, bem como a concentração de NaCl capaz de promover 50% de lise dos eritrócitos ($\mathbf{H_{50}}$). Quando a concentração de NaCl cai de 1,0 para 0,1%, a percentagem de hemólise aumenta até atingir um platô, de acordo com uma transição entre dois estados, o estado intacto (caracterizado pela percentagem de hemólise $\mathbf{A_{min}}$) e o estado hemolisado (caracterizado pela percentagem de hemólise $\mathbf{A_{max}}$). A figura também mostra como foram obtidos os valores da concentração de NaCl capaz de produzir 50% de hemólise ($\mathbf{H_{50}}$).

A **Figura 2.2** apresenta uma típica curva de estabilidade de eritrócitos de uma voluntária contra a concentração de etanol. Diferentemente do que acontece na curva de estabilidade contra NaCl, a percentagem de hemólise aumenta com o aumento na concentração de etanol, de acordo com uma transição entre dois estados, o estado intacto (caracterizado pela percentagem de hemólise $\mathbf{A_{min}}$) e o estado hemolisado (caracterizado pela percentagem de hemólise $\mathbf{A_{max}}$). A figura também mostra como foram obtidos os valores da concentração de etanol capaz de produzir 50% de hemólise ($\mathbf{D_{50}}$).

A **Figura 2.3** apresenta a dependência, de natureza negativa e estatisticamente significante ($P<0.05$), observada entre os valores de $\mathbf{H_{50}}$ e a idade das voluntárias a 37 °C. Isso significa que a estabilidade dos eritrócitos contra choque hipotônico aumenta com o aumento da idade.

A **Tabela 2.2** apresenta os parâmetros para a dependência linear entre $\mathbf{H_{50}}$ e a idade em diferentes temperaturas. As relações lineares entre $\mathbf{H_{50}}$ e a idade foram significantes a 26, 32, 37 e 42 °C, mas não a 47 °C.

A **Figura 2.4** apresenta a dependência, de natureza positiva e estatisticamente significante ($P<0.05$), observada entre os valores de $\mathbf{D_{50}}$ e a

idade das voluntárias. Isso significa que a estabilidade dos eritrócitos contra a desnaturação por etanol aumenta com o aumento da idade da voluntária.

A **Figuras 2.5** a **2.6** apresentam comparações das retas de dependência térmica de $\mathbf{H_{50}}$ entre as faixas etárias de 20 a 39 anos, de 40 a 59 anos e de 60 anos e acima. A reta da faixa de 20 a 39 anos apresentou diferença significante nas temperaturas mais baixas até 39,5 °C em relação à reta da faixa de 40 a 59 anos (**Figura 2.5**), mas foi significantemente diferente da reta da faixa de 60 anos e acima (**Figura 2.6**). Entretanto, não houve diferenças significantes entre as retas de dependência térmica de $\mathbf{H_{50}}$ da faixa etária de 40 a 59 anos em relação aquela de 60 anos e acima (**Figura 2.7**).

A **Tabela 2.3** apresenta os resultados das análises de correlação testadas entre os valores de $\mathbf{H_{50}}$ e os parâmetros nutricionais e hematológicos. A ausência de significância entre $\mathbf{H_{50}}$ e os escores do **MNA** indica que a estabilização dos eritrócitos com o aumento da idade não está relacionado a uma piora do estado nutricional com a idade. A ausência de significância entre $\mathbf{H_{50}}$ e os valores de **VCM** indica que a estabilização de eritrócitos humanos pela idade não é devida a diferenças de volume entre os eritrócitos no sangue das doadoras.

Tabela 2.1. Distribuição das voluntárias por estado nutricional* e faixa etária (N = 67).

Faixa etária (anos)	Desnutrido	Risco de desnutrição	Nutrido	Total
	%	%	%	%
20-39	0,0	10,4 (7)	41,8 (28)	52,2 (35)
40-59	0,0	1,5 (1)	16,4 (11)	17,9 (12)
> 60	0,0	12,0 (8)	17,9 (12)	29,9 (20)
Total	0,0	23,9 (16)	76,1 (51)	100,0 (67)

*De acordo com o escore do MNA: desnutrido (MNA ≤ 17,0); risco de desnutrição (MNA = 17,5-23,5; nutrido (≥ 24,0).

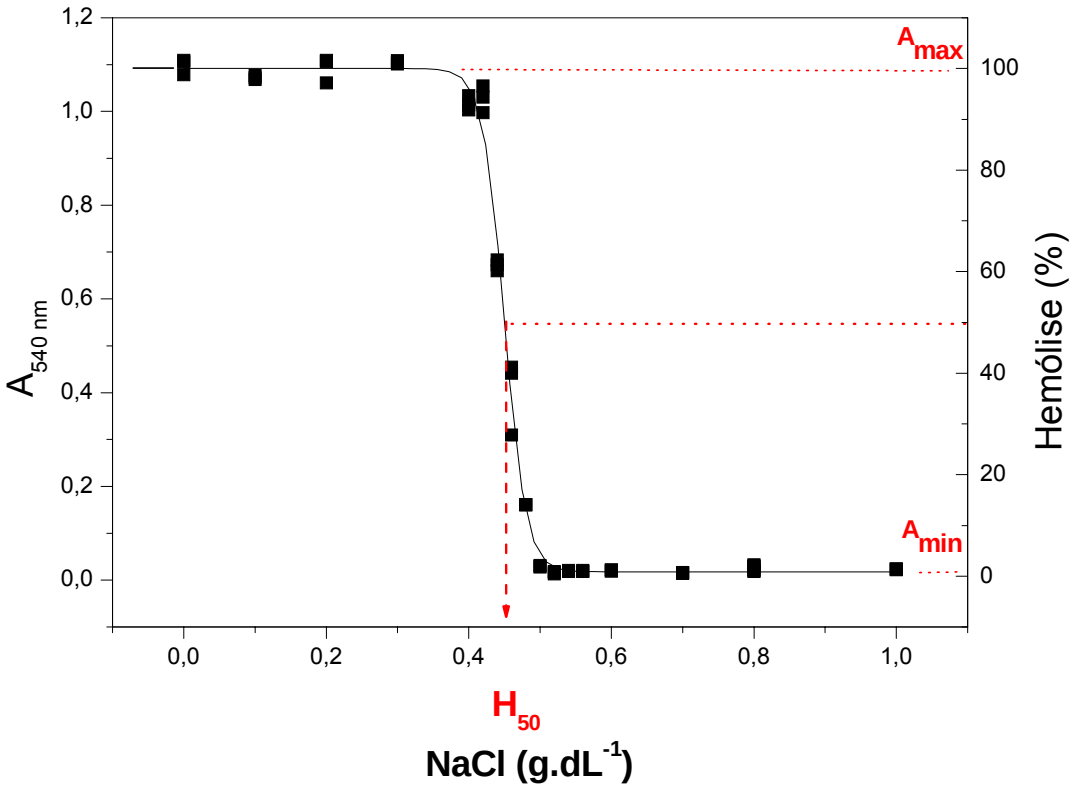

Figura 2.1. Curva típica obtida na avaliação da estabilidade de eritrócitos de uma voluntária contra estresse hipotônico. Condições experimentais: idade = 47 anos; temperatura = 37 °C. $\mathbf{H_{50}}$ é a concentração de NaCl necessária para promover 50% de hemólise. $\mathbf{A_{max}}$ e $\mathbf{A_{min}}$ representam as percentagens de hemólise nos estados hemolisado e intacto, respectivamente. A percentagem de hemólise diminui com o aumento da concentração de NaCl.

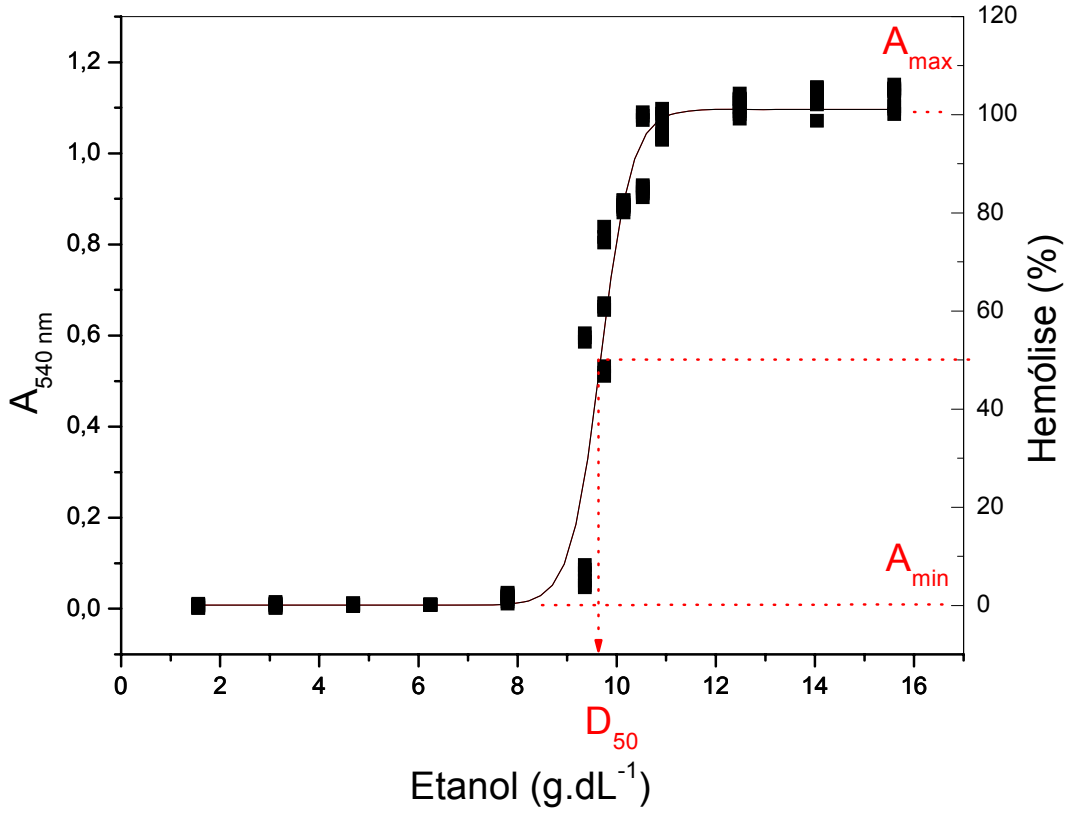

Figura 2.2. Curva típica obtida na avaliação da estabilidade de eritrócitos de uma voluntária contra a desnaturação por etanol. Condições experimentais: idade = 47 anos; temperatura = 37 °C. $\mathbf{D_{50}}$ representa a concentração de etanol para promover 50% de lise dos eritrócitos. $\mathbf{A_{min}}$ e $\mathbf{A_{max}}$ são as percentagens de hemólise nos estados intacto e hemolisado, respectivamente. A percentagem de hemólise aumenta com o aumento da concentração de etanol.

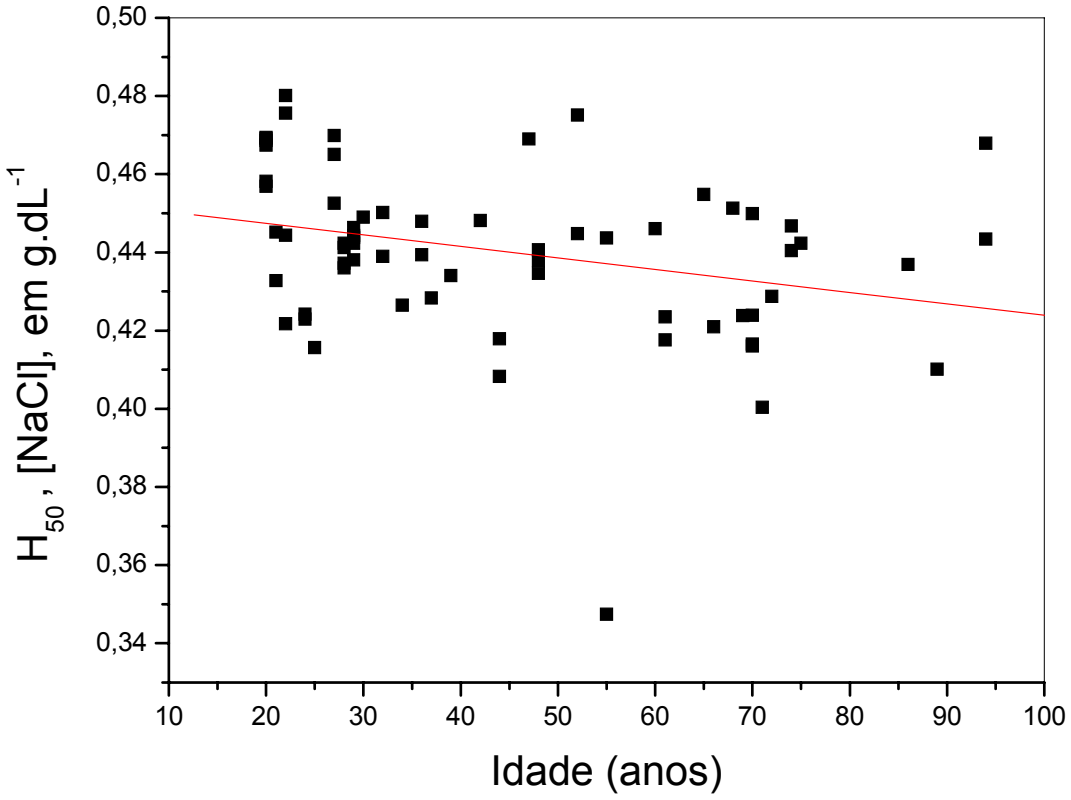

Figura 2.3. Dependência dos valores de **H_{50}**, a 37 °C, com a idade das voluntárias. Condições experimentais: temperatura = 37 °C; N = 67, R = - 0,592, P = 0,0001. A estabilidade dos eritrócitos contra choque hipotônico aumentou com o aumento da idade.

Tabela 2.2. Parâmetros obtidos nas análises de regressão linear da dependência entre a estabilidade dos eritrócitos (H_{50}) e a idade (anos) em diferentes temperaturas (n=67).

Temperatura (°C)	Interseção ± DP	Inclinação (x 10^4)	R	P
26	0,479 ± 0.0051	-5,12	-0,640	< 0,0001
32	0,470 ± 0.0044	-4,18	-0,617	< 0,0001
37	0,465 ± 0.0043	-3,82	-0,592	= 0,0001
42	0,458 ± 0.0047	-3,87	-0,560	= 0,0004
47	0,441 ± 0.0056	-1,53	-0,222	= 0,1928

DP = desvio padrão; R = coeficiente de correlação de Pearson; P = probabilidade da hipótese testada não ser verdadeira, considerada significante quando $P < 0,05$.

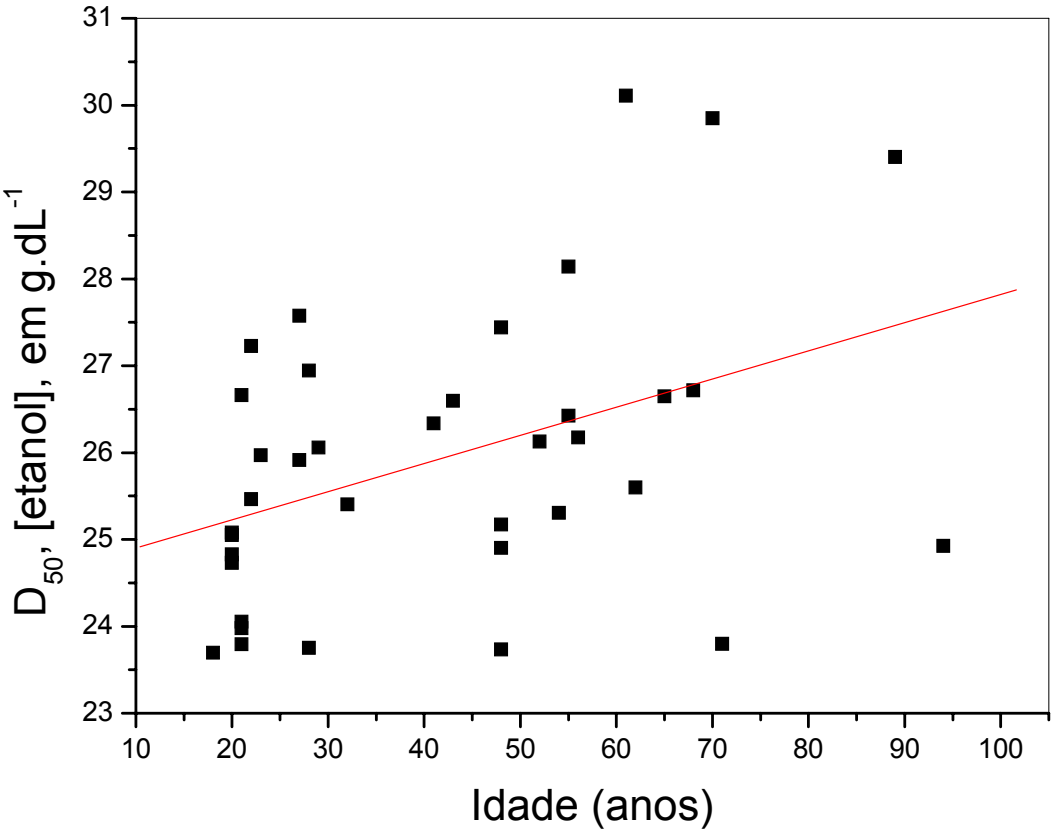

Figura 2.4. Dependência dos valores de **D_{50}** com a idade das voluntárias. N = 37; R = + 0,420; P = 0,00972. A estabilidade dos eritrócitos contra a desnaturação por etanol aumentou com o aumento da idade.

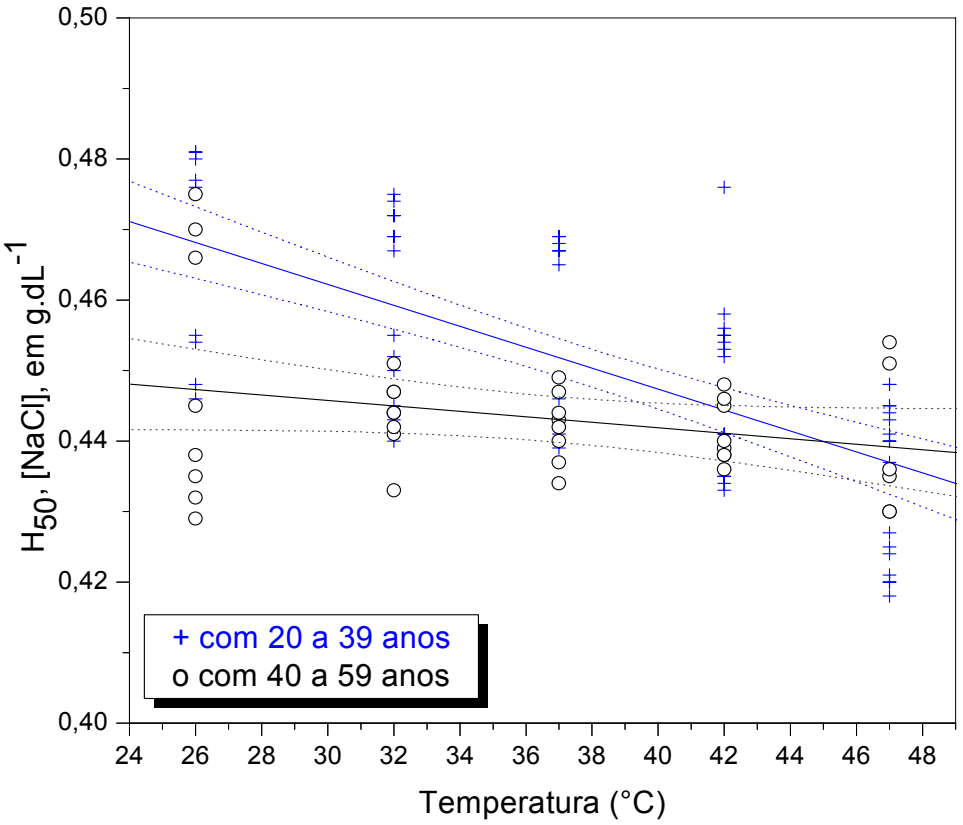

Figura 2.5. Comparação entre as retas de dependência térmica da estabilidade de eritrócitos de voluntárias contra estresse hipotônico (H_{50}) entre as faixas etárias de 20 a 39 anos e de 40 a 59 anos. Faixa de 20 a 39 anos: R = - 0,651, N = 85, P < 0,001. Faixa de 40 a 59 anos (R= - 0,280; N = 40; P = 0,08). As retas de regressão (linhas contínuas) foram mostradas entre as curvas representativas de seus respectivos intervalos de 95% de confiança (linhas pontilhadas). N = número de pontos experimentais. R = coeficiente de correlação de Pearson. P = probabilidade da hipótese testada não ser verdadeira, considerada significante quando $<$ 0,05.

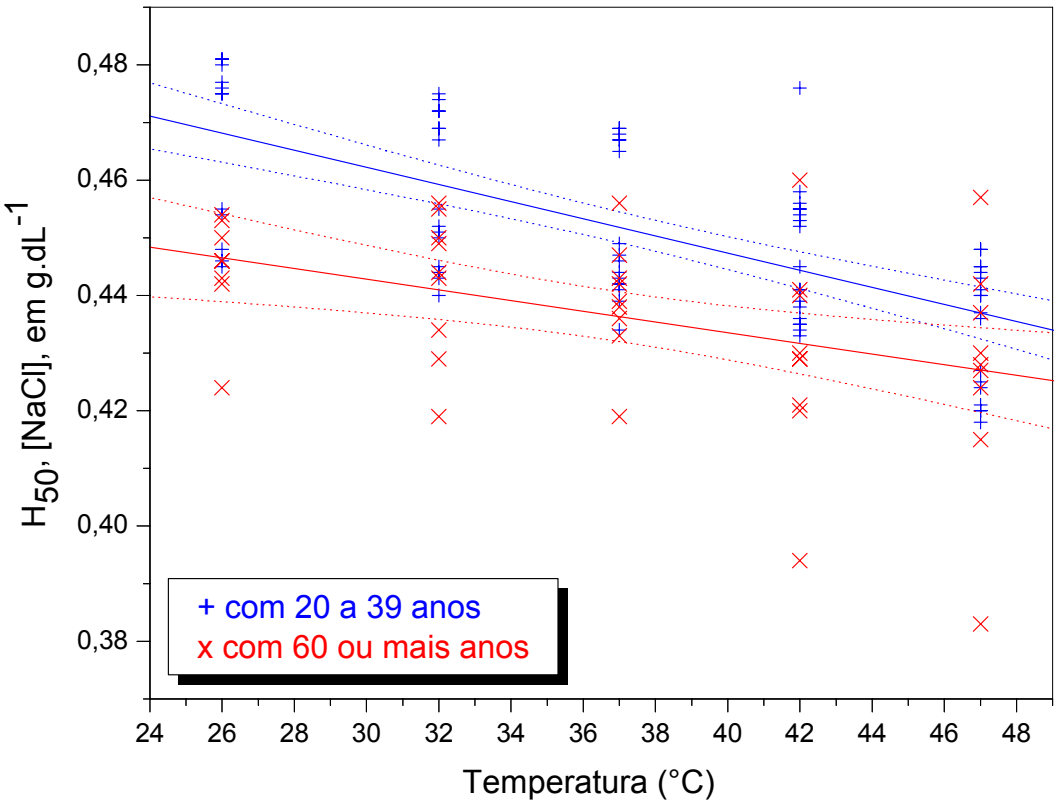

Figura 2.6. Comparação entre as retas de dependência térmica da estabilidade de eritrócitos das voluntárias contra estresse hipotônico (H_{50}) entre as faixas etárias de 20 a 39 e de 60 anos e mais de idade. Faixa de 20 a 39: R = - 0,651; N = 85; P < 0,001. Faixa de 60 anos e mais de idade R = - 0,439; N = 45; P = 0,00255. As retas de regressão (linhas contínuas) foram mostradas entre as curvas representativas de seus respectivos intervalos de 95% de confiança (linhas pontilhadas). N = número de pontos experimentais. R = coeficiente de correlação de Pearson. P = probabilidade da hipótese testada não ser verdadeira, considerada significante quando < 0,05.

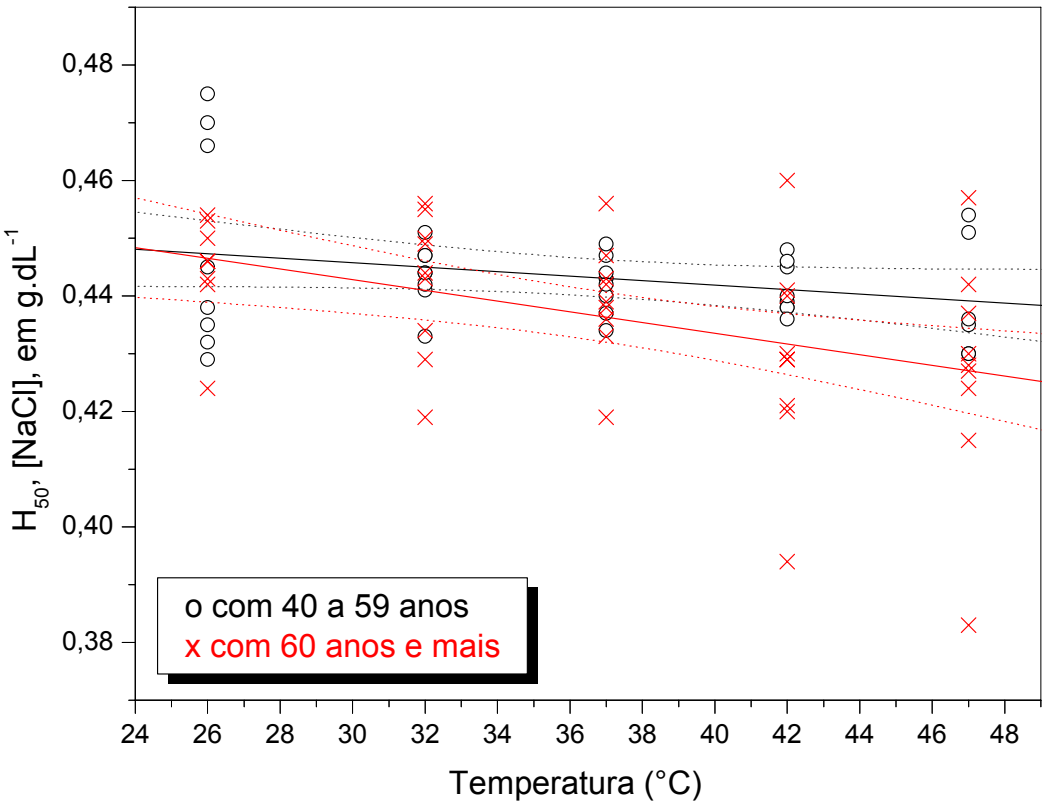

Figura 2.7. Comparação entre as retas de dependência térmica da estabilidade de eritrócitos das voluntárias contra estresse hipotônico (H_{50}) entre as faixas etárias de 40 a 59 e de 60 anos e mais de idade. Faixa de 40 a 59: R = - 0,280; N = 40; P = 0,08. Faixa de 60 anos e mais de idade: R = - 0,439; N = 45; P = 0,00255. As retas de regressão (linhas contínuas) foram mostradas entre as curvas representativas de seus respectivos intervalos de 95% de confiança (linhas pontilhadas). N = número de pontos experimentais. R = coeficiente de correlação de Pearson. P = probabilidade da hipótese testada não ser verdadeira, considerada significante quando $< 0,05$.

Tabela 2.3. Análise da relação entre $\mathbf{H_{50}}$ e alguns parâmetros nutricionais e hematológicos a 37 °C (N = 67).

Parâmetros	**Média ± DP**	**R**	**P***
Eritrócitos (milhões por mm^3)	4,27 ± 0,39	- 0,034	0,786
Hemoglobina ($g.dL^{-1}$)	14,05 ± 1,13	- 0,069	0,582
VCM (μm^3)	99,28 ± 4,84	+ 0,107	0,390
MNA (0-30 pontos)	25,73 ± 2,76	+ 0,047	0,711

*Dependência considerada significante quando P < 0,05.

DISCUSSÃO

Controle das fontes de variabilidade no comportamento dos eritrócitos

A falta de controle nas variáveis que são intrínsecas ao grupo populacional analisado é a razão da falha em se obter um perfil geral inequívoco da estabilidade de eritrócitos humanos com a idade das doadoras.

A composição de uma membrana biológica é resultado de influências genéticas, alimentação e estilo de vida. Estudos de comportamento de membranas com amostras pequenas somente faz sentido se usar voluntários que pertençam a uma região definida, com hábitos alimentares e estilos de vida semelhantes.

A exclusão dos indivíduos centenários é também importante, porque eles apresentam membranas com diferenças estruturais em relação aos indivíduos mais velhos da população em geral [CAPRARI *et al*., 1999; MAZZANTI *et al*., 2000; RABINI *et al*., 2002]. O comportamento de membrana daqueles indivíduos pode não fazer diferença em um estudo com toda a população humana ou pelo menos com amostras muito grandes, mas vai sem dúvida fazer diferença em estudos onde as amostras são pequenas, como este nosso estudo.

Desde que há diferenças hormonais e metabólicas entre os gêneros, que também diferem em relação à própria longevidade, nós conduzimos nosso estudo usando apenas voluntários do gênero feminino.

Embora a ingestão de etanol possa ser inserida entre os hábitos alimentares, como o etanol é um conhecido caotrópico, capaz de interagir com proteínas e fosfolipídeos de membrana e promover lise de eritrócitos, nós também excluímos as bebedoras regulares de etanol deste estudo. Além do efeito direto do etanol sobre a membrana [YINGST, POLASEK e KILGORE, 1985; ROTTENBERG, 1986], o metabolismo do etanol no fígado pode promover mudanças na distribuição lipídica [VASDEV *et al*., 1974], que seguramente é muito importante em termos da composição e estabilidade de nossas membranas.

Desde que nós controlamos essas variáveis, nós acreditamos que o perfil aqui obtido para a dependência da estabilidade dos eritrócitos com a idade seja uma expressão de diferenças estruturais entre indivíduos com idades diferentes.

Validade da tendência observada na dependência com a idade da estabilidade dos eritrócitos

A estabilidade de eritrócitos de voluntárias humanas contra choque hipotônico aumentou com o aumento da idade das doadoras de sangue não apenas a 37 °C **(Figura 2.3**), mas também em várias outras temperaturas (**Tabela 2.2**). Essa tendência fica muito evidente quando a linha de regressão da dependência térmica de H_{50} das mulheres acima de 60 anos é comparada à dependência térmica das mulheres com 20 a 39 anos (**Figura 2.6**). Os valores de H_{50} dentro das linhas de regressão foram menores para as mulheres acima de 60 anos em relação aquelas com 20 a 39 anos. Esses dados mostram que as mulheres acima de 60 anos tem eritrócitos com maior estabilidade contra choque hipotônico do que as mulheres da outra faixa etária.

Essa diferença de estabilidade não é exclusiva da lise por choque hipotônico, pois a estabilidade contra a lise pela ação do etanol também aumentou com o aumento da idade (**Figura 2.4**).

Uma vez controladas as outras condições de variabilidade, esse conjunto de evidências indica que o aumento da estabilidade de eritrócitos com o aumento da idade de suas doadoras é uma tendência inequívoca do comportamento de eritrócitos.

Racionalidade física da tendência observada na dependência com a idade da estabilidade dos eritrócitos

O que o aumento de estabilidade de eritrócitos com o aumento da idade deve significar?

A estabilidade dos eritrócitos depende da pressão [WEBER e BONT, 1996], variável que seguramente não interferiu em nossos resultados, porque nossos experimentos foram conduzidos *in vitro*, sob pressão ambiental.

A fragilidade osmótica dos eritrócitos depende da esfericidade dos eritrócitos e da tonicidade do meio [DELANO, 1995]. A tensão gerada na membrana dos eritrócitos em decorrência das modificações de forma observadas em diferentes tipos de hemoglobinopatias deve ser seguramente uma causa de instabilidade [PARPART, LORENZ e PARPART, 1947; SUESS, LIMENTANI e DAMESHESK, 1978]. Esta foi a razão por que nós selecionamos apenas indivíduos saudáveis

neste estudo. Entretanto, o envelhecimento está associado a anemias macrocíticas [HIN *et al*., 2006] que são causadas por deficiência de folato e cobalamina, o que prejudica a replicação das células da linhagem eritrocitária [BENDER e MAYES, 2003]. Esta deve ser a causa da presença de eritrócitos mais jovens no sangue de doadores mais velhos [GERSHON e GERSHON, 1988]. Se fosse essa a razão para o aumento na estabilidade dos eritrócitos, nós deveríamos ter obtido uma forte correlação entre $\mathbf{H_{50}}$ e os valores de **VCM**, o que não ocorreu (**Tabela 2.3**). Por outro lado, o envelhecimento também tem sido associado à ocorrência de anemias microcíticas, causadas por deficiência de ferro e de hemoglobina. Se essa fosse a razão para o aumento na estabilidade dos eritrócitos, nós deveríamos ter obtido uma correlação significante entre H_{50} e os níveis de hemoglobina das pacientes, o que de fato também não ocorreu (**Tabela 2.3**). Por outro lado, macrocitose e microcitose são causas conhecidas de anemia, que normalmente causam tensões estruturais que geralmente diminuem a estabilidade e a contagem dos eritrócitos no sangue. Realmente, em nossa amostra, nós não encontramos uma boa correlação entre os valores de $\mathbf{H_{50}}$ e a contagem de eritrócitos das voluntárias (**Tabela 2.2**).

Nossas voluntárias não foram recrutadas entre indivíduos institucionalizados, pois nas instituições de abrigo para idosos a desnutrição é uma tendência comum [ALVES DE RESENDE *et al*., 2005]. Eles foram indivíduos do gênero feminino entre 20 e 95 anos, completamente integrados em suas famílias, que provavelmente devem estar atendendo suas necessidades nutricionais sem maiores restrições. Realmente, não houve relação entre H_{50} e os escores de **MNA** das pacientes (**Tabela 2.2**).

A estabilidade de eritrócitos também pode ser afetada pela osmolaridade do meio. É bem conhecida na literatura a tendência que os idosos apresentam em desenvolver resistência à ação da insulina e intolerância à glicose, o que elevaria a osmolaridade do plasma humano. Embora, uma elevação na osmolaridade por açúcares como a glicose seja uma fator determinante de estabilização de complexos biológicos [BACK, OAKENFULL e SMITH, 1979], não acreditamos que este seja caso, pois os níveis de açúcares normalmente usados como estabilizantes são muito mais altos que os valores de glicemia mesmo de portadores de intolerância à glicose e diabetes mellitus. Níveis sanguíneos altos

de glicose associados à hiperinsulinemia poderiam sim afetar a lipogênese hepática e alterar os níveis de lipídeos endógenos circulantes. Esse poderia ser um fator importante na alteração na composição das membranas biológicas com o aumento da idade. Mas também não acreditamos que este seja o caso, pois o diagnóstico de diabetes mellitus foi um critério de exclusão usado neste trabalho.

Excluindo as possibilidades relacionadas com fatores nutricionais e patológicos, nós podemos considerar que o aumento na estabilidade dos eritrócitos seja decorrente de mudanças estruturais, com o aumento de idade, na composição das membranas dos eritrócitos.

De acordo com o dogma central da bioquímica, estabilidade é uma manifestação funcional da estrutura e qualquer mudança na estrutura irá afetar sua função. Essa relação estrutura-função não é válida somente para o mundo das biomoléculas, mas também para a realidade da estrutura de organelas, células, tecidos e órgãos.

Uma vez que a fluidez de uma membrana diminui com o aumento na concentração de colesterol e na razão entre ácidos graxos saturados e insaturados de seus fosfolipídeos [MARR e INGRAHAN, 1962; CRONAN e GELMANN, 1973; COOPER, 1978; HANSS e KOUTSOURIS, 1985; VAN BLITTERSWIJK, VAN DER MEER e HILKMAN, 1987; MANSILLA *et al*., 2004], esse tipo de alteração estrutural poderia ser uma causa provável do comportamento que nós descrevemos. Realmente, isso faz muito sentido com base nas elevadas razões entre ácidos graxos saturados e ácidos graxos insaturados observadas nos fosfolipídeos da membrana de eritrócitos de humanos idosos [BECKMAN e AMES, 1998; PRISCO *et al*., 1991; RABINI *et al*. 2002] e talvez no próprio padrão de assimetria observado nessas membranas [RIFKIND, ARAKI e HADLEY, 1983].

A estabilidade dos eritrócitos deve ser um reflexo da magnitude das forças atrativas de van der Waals entre as cadeias laterais dos fosfolipídeos presentes em suas membranas. Essa força aumenta com o aumento na proporção de colesterol e de ácidos graxos saturados nos fosfolipídeos de membrana. Assim, o aumento na estabilidade de eritrócitos com a idade seria conseqüente de uma mudança estrutural progressiva que estaria ocorrendo ao longo do tempo.

Mesmo que as células possam adaptar-se diante das condições ambientais, promovendo mudanças na composição ou estrutura de sua membrana [RUSSEL e FUKUNAGA, 1990], como os eritrócitos não têm síntese própria de lipídeos eles de fato devem ter uma composição de membrana dependente das condições do meio interno.

Concordância com idéias correntes nas ciências do envelhecimento

Como as funções de uma membrana são dependentes do seu grau de fluidez [DELICONSTANTINOS, 1987], mudanças estruturais durante a senescência poderiam promover alterações no funcionamento celular [GUTTERIDGE, 1993; BECKMAN e AMES, 1998; KASAPOGLU e OZBEN, 2001].

O envelhecimento é considerado estar associado a um aumento na produção de substâncias oxidantes e diminuição nas defesas anti-oxidantes [BECKMAN e AMES, 1998]. Realmente, os ácidos graxos polinsaturados presentes nos fosfolipídeos das membranas biológicas são muito susceptíveis ao ataque de radicais livres no processo chamado de peroxidação de ácidos graxos polinsaturados; [GUTTERIDGE, 1993; WISEMAN, 1996; BECKMAN e AMES, 1998].

A suscetibilidade da membrana do eritrócito ao estresse peroxidativo é considerada aumentar com o aumento da idade, o que promoveria uma diminuição na proporção de ácidos graxos polinsaturados na membrana com o aumento da idade. Esta suposição é razoável se considerarmos que dois dos ácidos graxos polinsaturados presentes nas membranas biológicas, o ácido linoléico e o ácido α-linolênico, que são precursores metabólicos para a biossíntese de diversos outros ácidos graxos polinsaturados de membrana, são essenciais na dieta humana [WISEMAN, 1996]. Assim, o aumento da idade e o aumento da ingestão de carboidratos favoreceriam o aumento na proporção de ácidos graxos saturados e monoinsaturados com o tempo. Se isto está realmente acontecendo, a membrana do eritrócito de humanos mais velhos deveria ser um alvo menos vulnerável ao estresse peroxidativo, uma vez que apresentaria uma baixa proporção de ácidos graxos polinsaturados em relação às membranas de humanos jovens. Isto de fato foi demonstrado na literatura [RABINI *et al*., 2002], embora também tenha sido reportada ausência de alteração com a idade na

vulnerabilidade de eritrócitos ao estresse oxidativo [ONARAN, YALÇIN e SULTUYBEK, 1997; GÜVEN *et al*., 1999].

Se o aumento da estabilidade de eritrócitos com o aumento da idade estiver relacionado com a diminuição no teor de ácidos graxos insaturados, isso poderia sob alguns aspectos constituir um elemento positivo na longevidade. Os vertebrados de vida longa têm baixos índices de insaturação nos ácidos graxos de seus lipídeos de membrana (PAMPLONA, BARJA e PORTERO-OTIN, 2002; PAMPLONA e BARJA, 2003). Esse baixo índice de insaturação seria vantajoso porque tornaria as membranas menos vulneráveis à lipoperoxidação (ARKING, 2006e). Isso faz sentido à luz do fato dos humanos, que estão entre os organismos mais longevos do planeta, tenham se tornado incapazes de sintetizar alguns ácidos graxos polinsaturados, os quais são de fato mais vulneráveis à lipoperoxidação, e não de ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Faz sentido também que os genes que geraram nosso padrão de especialização na lipogênese exerçam sua influência benéfica de maneira dualísticamente pleiotrópica. Essas especializações tornariam por um lado nossas membranas menos vulneráveis à lipoperoxidação, o que seria importante a curto e médio prazo, mas fariam com que nossas membranas viessem a ficar excessivamente rígidas a longo prazo. Essa perspectiva nos leva a acreditar que o envelhecimento e várias doenças crônicas degenerativas, os quais se manifestam na idade pós-reprodutiva, constituiriam o preço que temos que pagar pelos efeitos benéficos que nosso padrão de especialização na lipogênese teria até a idade reprodutiva.

Concordância com degenerações patológicas com o tempo

Se esse aumento na estabilidade está associado ao aumento na proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados, ele deve ser responsável pelo processo de rigidificação de membrana que estaria associado ao envelhecimento.

O que ocorre com as membranas dos eritrócitos deve refletir o que está ocorrendo também com as membranas de outras células do organismo.

Essa rigidificação de membrana deve seguramente prejudicar os processos de transdução de sinais através das membranas, acarretando em prejuízos à inserção de receptores (como os receptores de LDL] e de transportadores (como

o GLUT4), o que resultaria em aumento com a idade nos níveis de LDL-colesterol e na resistência à ação da insulina.

Essa rigidificação deve também alterar a capacidade da membrana em promover as mudanças de polaridade associadas à comunicação célula-célula, o que poderia justificar o declínio em mecanismos centrais associados à memória, cognição e controle da ação hormonal.

Os efeitos da mudança da composição nos fosfolipídeos de membrana compreendem questões que estão além do processo de rigidificação. Menores proporções entre ácidos graxos insaturados ω3 e ω6 têm sido associadas aos indivíduos mais velhos, embora esta proporção tenha sido mostrada estar elevada em centenários em relação aos idosos mais velhos [RABINI *et al*., 2002]. Os eicosanóides formados a partir de ácido graxos insaturados ω6 têm sido extensivamente associados à exacerbação da inflamação e de doenças imunes, enquanto os eicosanóides derivados de ácidos graxos insaturados ω3 têm sido descritos como capazes de modular a inflamação e imunidade associada aos eicosanóides derivados de ω6-UFA [CALDER, 1996; CALDER, 2004a; CALDER, 2004b; CALDER, 2004c; CALDER, 2004d; CALDER, 2005; SCHWAB e SERHAN, 2006]. Provavelmente, mesmo indivíduos com um alto conteúdo de ω3-UFA nos fosfolipídeos de suas células inflamatórias também podem ter problema com a produção de eicosanóides derivados de ω3-UFA, em conseqüência da rigidificação da membrana, simplesmente porque a rigidificação da membrana irá limitar o acesso da fosfolipase A_2.

A degeneração de origem inflamatória e imune pode ser conseqüente da combinação de uma baixa oferta nutricional de ω3-UFA com uma menor acessibilidade a esses ácidos graxos na membrana biológica das células inflamatórias.

Se essa hipótese for verdadeira, haveria também uma restrição de acesso aos ω6-UFA. Mas desde que os ω6-UFA estão presentes em uma concentração muitas vezes maior que os ω3-UFA, a formação de eicosanóides derivados de ω6-UFA deveria ser favorecida com base na lei de ação das massas.

A baixa biodisponibilidade endógena de ω3-UFA e de outros fatores nutricionais poderia ser uma das razões que levaria indivíduos aparentemente

saudáveis a apresentar anomalias degenerativas em intervalos de tempo mais amplos. Ela também poderia justificar por que a suplementação com ω3-PUFA nem sempre produza os efeitos benéficos descritos para eles [CONNOR, 2000; BENATTI *et al*., 2004], embora outro tipo de intervenção, a restrição calórica tenha sido associada à atenuação de muitas doenças degenerativas [HURSTING *et al*., 2003; DAS, 2005; MATTSON, 2005; RITZ e GARDNER, 2006]. Uma diminuição na ingestão energética irá diminuir a lipogênese e a oferta de ácidos graxos saturados para as membranas biológicas, o que poderia aumentar a acessibilidade dos fosfolipídeos de membrana à ação da fosfolipase A_2.

CONCLUSÕES

A estabilidade dos eritrócitos contra estresse hipotônico e desnaturação por etanol aumentou com a idade de suas doadoras. Este aumento na estabilidade de eritrócitos não foi determinado por diferenças no estado nutricional e nem por diferenças no volume corpuscular médio. A estabilidade dos eritrócitos das voluntárias diminuiu significantemente com o aumento na temperatura entre 26 e 47 °C. As mulheres com mais de 60 anos apresentaram eritrócitos com maior estabilidade do que aquelas com 20 a 39 anos nesse intervalo térmico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. (2002). Membrane Structure. In: ALBERTS, B. (ed) **Molecular Biology of the Cell**. 4nd. ed. New York, Garland Publishing Inc, 1616 pp.

ALDRICH, K.; SAUNDERS, D.K. (2001). Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. **Journal of Thermal Biology**, 26, 179-182.

ALEXANDROV, V.Y. (1979). Cell reparation of non-DNA injury. **International Review of Cytolology**, 60, 223-269.

ALVES DE RESENDE, C.H.; MARQUES CUNHA, T.; ALVARENGA JÚNIOR, V.; PENHA-SILVA, N. (2005). Dependence of mini-nutritional assessment scores with age and some hematological variables in elderly institutionalized patients. **Gerontology**, 51, 316-321.

AMINOFF, D. (1988). The role of sialoglycoconjugates in the aging and sequestration of red cells from circulation. **Blood Cells**, 14, 229-247.

ARAKI, K.; RIFKIND, J.M. (1981). The rate of osmotic hemolysis. A relationship with membrane bilayer fluid. **Biochemica et Biophysica Acta**, 645(1), 81-90.

ARKING, R. A. (2006a). Theory of aging over the life span. In: ARKING, R. (ed.) **Biology of Aging**: observations and principles. 3nd. ed. Oxford, Oxford University Press, p. 483-501.

ARKING, R. (2006b). Evolutionary and comparative aspects of senescence. In: ARKING, R. (ed.) **Biology of Aging**: observations and principles. 3nd. ed. Oxford, Oxford University Press, p. 95-131.

ARKING, R. (2006c). Measuring age related changes in individuals. In: ARKING, R. (ed.) **Biology of Aging**: observations and principles. 3nd. ed. Oxford, Oxford University Press, p. 54-92.

ARKING, R. (2006d). Measuring age related changes in populations. In: ARKING, R. (ed.) **Biology of Aging**: observations and principles. 3nd. ed. Oxford, Oxford University Press, p. 26-53.

ARKING, R. (2006e). Systemic theories of aging. In: ARKING, R. (ed.) **Biology of Aging**: observations and principles. 3nd. ed. Oxford, Oxford University Press, p. 395-418.

ARRUDA, I.K.G.; ARRUDA, B.K.G. (1994). Nutrição e Desenvolvimento. **Cadernos de Saúde Pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública,** 10(3), 392-397.

ARUOMA, O.I. (1994). Free radical and antioxidant strategies in sports. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 5, 370-381.

AUSTAD, S. N. (1997). **Why we age**: what science is discovering about the body's journey through life. New York, John Wiley & Sons, 244 pp.

BACK, J.F.; OAKENFULL, D.; SMITH, M.B. (1979). Increased thermal stability of proteins by sugars and polyols. **Biochemistry**, 18, 5191-5196.

BARROCAS, A. (2000). Rastreamento nutricional. In: WAITZBERG, D.L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica.** 3ª ed. São Paulo: Atheneu, p. 343-373.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, 78, 547-581.

BENATTI, P.; PELUSO, G.; NICOLAI, R.; CALVANI, M. J. (2004). Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. **Journal of the American College of Nutrition**, 23(4), 281-302.

BENDER, D.A.; MAYES, P.A. (2003). Vitamins and minerals, In: MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A., RODWELL, V.W. (Eds.), **Harper's Biochemistry**. McGraw-Hill, New York, p. 481-497.

BIAGI, P.L.; BORDONI, A.; LORENZINI, A.; HORROBIN, D.F.; HRELIA, S. (1999). Essential fatty acid metabolism in long term primary cultures of rat cardiomyocytes: a beneficial effect of n-6:n-3 fatty acids supplementation. **Mechanisms of Ageing and Development,** 107, 181-195.

BLEDA, M.J.; BOLIBAR, I.; PARES, R.; SALVA, A. (2002). Reliability of the mini nutritional assessment (MNA) in institutionalized elderly people. **The Journal of Nutrition, Health & Aging**, 6, 134-137.

BRIEFEL, R. R.; WOTECKI, C. E. (1992). Development of the food sufficiency questions for the third National Health and Nutrition Examination Survey. **Journal of Nutrition Education**, 24, 24-28.

BUDTZ-JÖRGENSEN, E.; CHUNG, J.P.; MOJON, P. (2000). Successful aging - the case for prosthetic therapy. **Journal of Public Health Dentistry**, 60(40), 308-312.

CALDER, P.C. (1996). Effects of fatty acids and dietary lipids of the immune system .**The Proceedings of the Nutrition Society**, 55, 127-150.

CALDER, P.C. (2004a). Long-chain n-3 fatty acids and cardiovascular disease: further evidence and insights. **Nutrition Research**, 24 (10), 761-772.

CALDER, P.C. (2004b). n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. **Clinical Science**, 107(1), 1-11.

CALDER, P.C. (2004c). n-3 Fatty acids, inflammation, and immunity: relevance to post surgical and critically ill patients. **Lipids**, 39, 1147-1161.

CALDER, P.C. (2004d). Polyunsaturated fatty acids and inflammation: (Omega 3 fatty acids: metabolic aspects). **Oleagineux, Corps gras, Lipides**, 11 (1), 38-45.

CALDER, P.C. (2005). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Biochemical Society Transactions,** 33(2), 423-427.

CAPRARI, P.; SCUTERRI, A.; SALVATI, A. M.; BAUCO, C.; CANTAFORA, A.; MASELLA, R.; MODESTI, D.; TARZIA, A.; MARIGLIANO, V. (1999). Aging and red blood cell membrane: a study of centenarians. **Experimental Gerontology**, 34, 47-57.

CHEN, J.J.; YU, B.P. (1994). Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. **Free Radical Biology & Medicine**, 17(5), 411- 418.

CHIU, D.; KUYPERS, F.; LUBIN, B. (1989). Lipid peroxidation in human red cell. **Seminars in Hematology**, 26, 257-276.

CHOW, C.S. (1991). Vitamin E and oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, 302(30), 756-760.

CLARK, W.R. (1999). **A Means to an End**: the biological basis of aging and death. New York, Oxford University Press, 234 pp.

CONNOR, J.E. (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and diseases. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 71, 171S-75S.

COOPER, R.A. (1975). Modification of red cell membrane structure by cholesterol rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect. **Journal of Clinical Investigation**, 55, 115-126.

COOPER, R.A. (1978). Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. **Journal of Supramolecular Structure**, 8, 413-430.

COOPER, C.E.; VOLLAARD, N.B.J.; CHOUERI, T.; WILSON, M.T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, 30, 280-285.

COVINSKI, K.; MARTIN, G.; BEYTH, R.J. (1999). The relationship between clinical assessment and nutritional status and adverse outcomes in older hospitalized patients. **Journal of the American Geriatrics Society**, 47, 532-538.

CRIBIER, S.; MORROT, G.; ZACHOWSKI, A. (1993). Dynamics of the membrane lipid phase. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids** , 48(1), 27-32.

CRISTOFALO, V.J.; GERHARD, G.S.; PIGNOLO, R.J. (1994). Molecular biology of aging**. The Surgical Clinics of North America**, 74, 1-21.

CRONAN, J.E.; GELMANN, E.P. (1973). An estimate of the minimum amount of unsaturated fatty acid required for growth of Escherichia coli. **The Journal of Biological Chemistry**, 248, 1188-1195.

DANIELLI, J. F.; DAVSON, H. (1935). A contribution to the theory of permeability of thin films. **Journal of Cellular and Comparative**, 5, 495-508.

DAS, U.N. (2005). A defect in the activity of Δ^6 and Δ^5 dessaturases may be a factor predisposing to the development of insulin resistence syndrome. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 72**,** 343-350.

DE MENDOZA, D.; CRONAN, J.E. (1983). Thermal regulation of membrane lipid fluidity in bacteria. **Trends in Biochemical Sciences**, 8, 49-52.

DEHOOG, S. (1998). Avaliação do estado nutricional. In: MAHAN, K.L., ESCOTT-STUMP, S. **Krause: Alimentos, Nutrição & Dietoterapia.** 9ª ed, São Paulo, Roca, pp. 371-396.

DELANO, M.D. (1995). Simple physical constraints in hemolysis. **Journal of Theoretical Biology**, 175, 517-524.

DELICONSTANTINOS, G. (1987). Physiological aspects of membrane lipid fluidity in malignancy. **Anticancer Research**, 7, 1011-1021.

DEVLIN, M. (2000). The nutritional needs of the older person. **Professional Nurse** (London, England), 1, 950-955.

DIPLOCH, A. (1991). Antioxidant nutrients and disease prevention an overview. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 53, 189-193.

DOBZHANSKY, T. (1973). Nothing in biology makes sense except in the light of evolution. **The American Biology Teacher**, 35, 125-129.

DONINI, L.M.; SAVINA, C.; ROSANO, A.; DE FELICE, M.R.; TASSI, L.; DE BERNARDINI, L.; PINTO, A.; GIUSTI, A.M.; CANNELLA, C. (2003). MNA predictive value in the follow-up of geriatric patients. **The Journal of Nutrition, Health & Aging**, 7, 282-293.

DORMENVAL, V.; MOJON, P.; BUDTZ-JÖRGENSEN, E. (1999). Associations between self-assessed mastigatory ability, nutritional status, prosthetic status and salivary flow rate in hospitalized elders. **Oral Diseases**, 5(1), 32-38.

DOUGHERTY, R.M.; GALLI, C.; FERRO-LUZZI, A.; IACONO, J.M. (1987). Lipid and phospholipid fatty acid composition of plasma, red blood cells, and platelets and how they are affected by dietary lipids: A study of normal subjects from Italy, Finland, and the USA. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 45, 443-455.

ELIA, M.; ZELLIPOUR, L.; STRATTON, R.J. (2005). To screen or not to screen for adult malnutrition? **Clinical Nutrition**, 24, 867-884.

FERNANDEZ-ALBERTI, A.; FINK, N.E. (2000). Red blood cell osmotic fragility confidence intervals: a definition by application of a mathematical model. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine : CCLM / FESCC**, 38, 433-436.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 43(1), 61-68.

FLOYD, R.A. (1991). Oxidative damage to behaviour during aging. **Science**, 254, 1597.

FRASER, C.G.; WILKINSON, S.P.; NEVILLE, R.G.; KNOX, J.D.E.; KING, J.F.; MACWALTER, R.S. (1989). Biologic variation of common haematologic laboratory quantities in the elderly. **American Journal of Clinical Pathology**, 92, 465-470.

FRISANCHO, A.R. (1988). Nutritional anthropometry. **Journal of the American Dietetic Association**, 88(5), 553-555.

GARZETTI, G.G.; TRANQUILLI, A.L.; CUGINI, A.M.; MAZZANTI, L.; CESTER, N.; ROMANINI, C. (2001). Altered lipid composition, increased lipid peroxidation, and altered fluidity of the membrane as evidence of platelet damage. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, 25(6), 352-355.

GERSHON, H.; GERSHON, D. (1988). Altered enzyme function and premature sequestration of erythrocytes in aged individuals. **Blood Cells**, 14, 93-101.

GOODE, H.F.; WEBSTER, N.R. (1993). Free radicals and antioxidants in sepsis. **Critical Care Medicine**, 21(1), 1770-1776.

GORDON, J. (1953). The protective action of some amino-acids against the effect of heat on compliment. **The Journal of Hygiene**, 51, 140-144.

GU, L.; SMITH, W.A.; CHARTZIMAVROUDIS, G.P. (2005). Mechanical fragility calibration of red blood cells. **ASAIO Journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)**, 51(3), 194-201.

GUARENTE, L. (1999). Mutant mice live longer. **Nature**, 402, 243-245.

GUARENTE, L.; KENYON, C. (2000). Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. **Nature**, 408, 255-262.

GUIGOZ, Y.; VELLAS, B.; GARRY, P.J. (1994). Mini Nutritional Assessment: a practical assessment tool for grading the nutritional state of elderly patients. **Facts Res. Gerontol**, 2, S15-S59.

GUIGOZ, Y.; VELLAS, B.; GARRY, P.J. (1996). Assessing the nutritional status of the elderly: the mini nutritional assessment as part of the geriatric evolution. **Nutrition Reviews**, 54, 559-565.

GUIGOZ, Y.; LAUQUE, S.; VELLAS, B.J. (2002). Identifying the elderly at risk for malnutrition. The Mini Nutritional Assessment. **Clinics in Geriatric Medicine**,18, 737-757.

GUTTERIDGE, J.M.C. (1993). Free radicals in disease processes: a compilation of causes and consequences. **Free Radical Research Communications**, 19, 141-150.

GUVEN, M.; OZKILIÇ, A.; SULTUYBEK, O.K.; ULUTIN, T. (1999). Age related changes on glucose transport and utilization of human erythrocytes. Effect of oxidative stress. **Gerontology**, 45(2), 79-82.

HAJRI, T.; ABUMRAD, N.A. (2002). Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. **Annual Review of Nutrition**, 33, 383-415.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (1989). **Free Radical in Biology and Medicine**. 2nd. ed. Oxford, University Press, 543 pp.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal íons in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, 186, 1-85.

HALLIWELL, B. (1992). How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical Research Communications**, 9, 1-32.

HANCOCK, J.T. (2001). Superoxide, hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules: their production and role in disease. **British Journal Biomedical Science**, 54, 38-46.

HANSS, M.; KOUTSOURIS, D. (1985). The role of membrane lipids in erythrocute rheology. **Colloids Surface**, 14, 216-225.

HARMAN, D. (1956). Aging: a theory based on the free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, 11, 298-300.

HARMAN, D. (1991). The aging process: major risk factor for disease and death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 88, 5360- 5363.

HARMAN, D. (1994). Free-radical theory of aging, increasing the functional life span. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 717, 1-15.

HARRISON, R. (2002). Struture and function of xantine oxidoredutase: Where are we now? **Free Radical Biology & Medicine**, 33(6), 774-797.

HAYFLICK, L. (1994). How and why we age. New York, Ballantine Books.

HAYFLICK, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level: a review. **Biochemistry**, 62(11), 1180-1190.

HAYFLICK L. (1998). How and why we age. **Experimental Gerontology**, 33, 639-653.

HENSLEY, K.; ROBINSON, K.A.; GABBITA, S.P.; SALSEAN, S.; FLOYD, R.A. (2000). Reactive oxygen species. Cell signaling and cell injury. **Free Radical Biology & Medicine***,* 28, 1456-1462.

HERSHKO, C. (1989). Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, 26(4), 277-285.

HOCMAN, G. (1979). Biochemistry of ageing. **The International Journal of Biochemistry**, 10, 867-876.

HOLLOSZY, J.O.; SCHECHTMAN, K.B. (1991). Interactions between exercise and food restriction: effects on longevity of males rats. **Journal of Applied Physiology**, 70, 1529-1535.

HORTON, R.H; MORAN, L.A; OCHS, R.S; RAWN, J.D; SCRIMGEOUR, K.G. (1996). **Principles of Biochemistry**, 2ª ed, Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

HUDGENS, J.; LANGKAMP-HENKEN, B.; STECHMILLER, J. K.; HERRLINGER-GARCIA, K. A.; NIEVES, C. Jr. (2004). Immune function is impaired with a mini nutritional assessment score indicative of malnutrition in nursing home elders with pressure ulcers. **JPEN. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, 28(6), 416-422.

HURSTING, S.D.; LAVIGNE, J. A.; BARRIGAN, D.; PERKINS, S. N.; BARRETT, J.C. (2003). Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. **Annual Review of Medicine**, 54, 131-152.

IVANOV, I.T. (1999). Investigation of surface and shape changes accompanying the membrane alteration responsible for the heat-induced lysis of human erythrocytes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 13, 311-323.

JACKSON M.J. (1999). Free radicals in skin and muscle: damaging agents or signals for adaptation? **Proceedings Nutritional Society**, 58(3), 673-676.

JACOB FILHO, W.; SOUZA R.R. (1994). Anatomia e fisiologia do envelhecimento. In: CARVALHO FILHO, E.T.; PAPALÉO NETTO, M. **Geriatria**: fundamentos, clínica e terapêutica. São Paulo, Atheneu, pp. 31-40.

JACOB, M.J. (1985). The integrated antioxidants systems. **Nutrition Research**,15, 755-765.

JAIN, N.C. (1986). Hematology techniques. In: JAIN, N.C. (ed.) **Shalm's Veterinary Hematology.** Philadelphia, Lea & Febiger, pp. 64-71.

JEEJEEBHOY, K.N.; DETSKY A.S.; BAKER J.P. (1990). Assessment of nutritional status. JPEN. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, 14(5), 193S- 6S.

JEEJEEBHOY, K.N. (1998). Nutritional assessment**. Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)**, 27(2), 347-369.

JOZWIAK, Z.; JASNOWSKA, B. (1985). Changes in oxygen-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in human erythrocytes as a function of age of donor. . **Mechanisms of Ageing and Development**, 32 , 77-83.

JUMP, D.B. (2002). The biochemistry of n-3 polyunsaturayed fatty acids. **The Journal of Biological Chemistry**, 277, 8755-8758.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (2000). **Biologia celular e molecular**. 7ª. Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 76-102.

JURIVICH, D.A.; QIU, L.; WELK, J.F. (1997). Attenuated stress responses in young and old human lymphocytes. **Mechanisms of Ageing and Development**, 94, 233-249.

KASAPOGLU, M.; OZBEN, T. (2001). Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. **Experimental Gerontology**, 36, 209-220.

KATO, S.; KAWASE, T.; ALDERMAN, J.; INATORI, N.; LIEBER, C.S. (1990). Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation. **Gastroenterology**, 98(1), 203-210.

KAY, M.M.B.; GOODMAN, S.; WHITFIELD, C.; WONG, P.; ZAKI, L.; RUDLOFF, V. (1984). The senescent cell antigen is immunologically related to band 3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 80, 1631-1638.

KAY, M.M.B.; BOSMAN, G.J.; SHAPIRO, S.S.; BENDICH, A.; BASSEL, P.S. (1986). Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 83, 2463-2467.

KIRKWOOD, T. (1999). **Time of Our Lives**: The science of human aging. New York, Oxford University Press, 277 pp.

KIRKWOOD, T.B.L. (1985). Comparative Evolutionary Aspects of Longevity. In: **Handbook of the Biology of Aging**, Finch, C.E.; Schneider, E.L. (Eds), 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold, pp. 27-45.

KIRKWOOD, T.B.L. (1987). Immortality of the germ-line versus disposability of the soma. In: WOODHEAD, A.D.; THOMPSON, K.H. (eds.). **Evolution of Longevity in Animals**: a comparative approach. New York, Plenum Press, pp. 209-218.

KIRKWOOD, T.B.L.; ROSE M.R. (1991). Evolution of Senescence: Late Survival Sacrificed for Reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, B332, 15-24.

KLEIN, W.; WEBER M.H.; MARAHIEL, M.A. (1999). Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent swith in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. **Journal of Bacteriology**, 181, 5341-5349.

KOSOWER, N.S. (1993). Altered properties of erythrocytes in the aged. **American Journal of Hematology**, 42, 241-247.

KOURY J.C.; DONANGELO C.M. (2003). Zinc, oxidative stress and physical activity. **Revista de Nutrição**, 16(4), 433-441.

LI, G.C.; FISHER, G.A.; HAHN, G.M. (1982). Induction of thermotolerance and evidence for a well-defined thermotropic cooperative process. **Radiation Research**, 89, 361-368.

LITHGOW, G.J. (1996). Molecular genetics of *Caenorhabditis elegans* aging. In: SCHNEIDER, E.L., ROWE, J.W. (eds.) **Handbook of the Biology of Aging***.* San Diego, Academic Press, p. 55-73.

MACARTHUR, R. H.; WILSON, E.O. (1967). The Theory of Island Biogeography. Princeton, Princeton University Press.

MACHLIN, L.J.; BENDICH, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, 1, 441-445, 1987.

MACKAY, W.J.; ORR, W.C.; BEWLEY, G.C. (1990). Genetic and molecular analysis of antioxidant enzymes in *Drosophila melanogaster:* a correlation between catalase activity levels, life span, and spontaneous mutation rate. In: Finch, C.E, Johnson, T.E. (eds.) **Molecular Biology of Aging***.* New York, Wiley-Liss, p. 157-170.

MAKINDE, M.O.; BOBADE, P.A. (1994). Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. **Research in Veterinary Science***,* 57(3), 343-348.

MANSILLA M.C.; CYBULSKI L.E.; ALBANESI, D.; DE MENDOZA, D. (2004). Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. **Journal of Bacteriology**, 186(20), 6681-6688.

MARIN, M.S.; FERNANDEZ, A.; SANCHEZ-YAGUE, J.; CABEZAS, J.A. (1990). Changes in the phospholipids and fatty acid composition in normal erythrocytes from sheep of different ages. Aminophospholipid organization in the membrane bilayer. **Biochimie**, 72, 745-750.

MARR, A.G.; INGRAHAN J.I. (1962). Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, 84, 1260-1267.

MATTSON, M.P. (2005). Energy intake, meal frequency, and healthy: a neurobiological perspective. **Annual Review of Nutrition**, 25, 237-260.

MAZZANTI, L.; RABINI, R. A.; PETRUZZI, E.; STAFFOLANI, R.; SALVOLINI, E.; VIGNINI, A.; BRACONI, M.; FRANCESCHI, C. (2000). Erythrocyte membranes obtained from centenarians show different functional properties. **Journal of the American Geriatrics Society**, 48, 350-351.

MCEVOY, L.; WILLIAMSON, P.; SCHLEGEL, R.A. (1986). Membrane phospholipids asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 83, 3311- 3315.

MCWHIRTER, J.P.; PENNINGTON C.R. (1994). Incidence and recognition of malnutrition in hospital. **British Medical Journal**, 308, 945-948.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI R. (1983). Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **The Biochemical Journal**, 218, 273-275.

MILES, E.A.; CALDER, P.C. (1998). Modulation of immune by dietary fatty acids. **The Proceedings of the Nutrition Society**, 57, 277-92.

MIÑANA, V.; ROVIRA. F. (2001). Evaluacion antropométrica del estado nutricional y estimación de las ingestas de hierro y de vitamina C de mujeres posmenopáusicas. **Nutrición Hospitalaria**, 5, 162-169.

MOECKEL, G.W.; SHADMAN, R.; FOGEL, J.M.; SADRZADEH, S.M.H. (2002). Organic osmolytes betaine, sorbitol and inositol are potent inhibitors of erythrocytes membrane ATPase. **Life sciences**, 71(20), 2413-2424.

MOTA, M.P.; FIGUEIREDO, P.A.; DUARTE, J.A. (2006). Teorias biológicas do envelhecimento. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, 4(1), 81-110, 2006.

MUTUS, B.; RABINI, R.A.; FRANCESHI, C.; PAOLISSO, G.; RIZZO, M.R.; RAGNO, E.; RAPPELLI, A.; BRACONI, M.; MAZZANTI, L. (2000). Cellular resistance to homocysteine: a key for longevity? **Atherosclerosis**, 152, 527-528.

NAJAS, M.S.; SACHS, A. (1996). Avaliação Nutricional do idoso. In: PAPALÉO NETTO, M. **Gerontology: a velhice e o envelhecimento em visão globalizada**. São Paulo: Atheneu, p. 242-247.

NAVARRO, J.; OBRADOR, E.; CARRETERO, J.; PETSCHEN, I.; AVIÑÓ, J.; PEREZ, P.; ESTRELA, J.M. (1999). Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo - modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth. **Free Radical Biology & Medicine**, 26(3), 410-418.

NELSON, D.L.; COX, M.M. (2005). **Lehninger Principles of Biochemistry**, 4th. ed. New York: Worth, 1216 pp.

OLIVIERI, O.; STANZIAL, A.M.; GIRELLI, D.; TREVISAN, M.T.; GUARINI, P.; TERZI, M.; CAFFI, S.; FONTANA, F.; CASARIL, M.; FERRARI, S.; CORROCHER, R. (1994). Selenium status, fatty acids, vitamins A and E, and aging. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 60, 510–517.

OMRAN, M.L.; MORLEY, J.E. (2000). Assessment of protein energy malnutrition in older persons, part I: history, examination, body composition, and screening tools. **Nutrition**, 16, 50–63.

ONARAN, Y.; YALÇIN, A.S.; SULTUYBEK, G. (1997). Effect of donor age on the susceptibility of erythrocytes and erythrocytes membranes to cumene hydroperoxide. **Mechanisms of Ageing and Development**, 98(2), 127-138.

ORCUTT, R.H.; THURMOND, S.T.; FERSLEW, K.E. (1995). Mathematical modeling of the osmotic fragility of rabbit red blood cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 34(3), 169-174.

ORR, W.C.; SOHAL, R.S. (1994). Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. **Science**, 263, 1128-1130.

ÖZAYDIN, A.; ONARAN, L.; AVSAR, K.; TEZCAN, V.; SULTUYBEK. (2001). Relationship between aging and susceptibility to oxidative damage: an assessment by erythrocyte membrane proteins and lipids. **Turkish Journal of Medical Sciences**, 31, 95-101.

OZTÜRK, L.; MANSOUR, B.; YÜKSEL. M.; GÖKHAN, N. (2003). Lipid peroxidation and osmotic fragility of red blood cells in sleep-apnea patients. **Clinica Chimica Acta**, 332, 83-88.

PACKER, L. (1997). Oxidants, antioxidants, nutrients and the athlete. **Journal of Sports Sciences**, 15, 353-363.

PAMPLONA, R.; BARJA, G.; PORTERO-OTIN, M. (2002). Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span. **Annals of the New York Acadedmy of Sciences**, 959, 475-470.

PAMPLONA, R.; BARJA, G. (2003). Aging rate, mitocondrial free radical production, and constitutive sensitivity to lipid peroxidation: insights from comparative studies. In: VON ZGLINICKI, T. (ed.) **Aging at the molecular level**. Dordrecht, Kluvwer Academic Publishers, pp. 47-64.

PAOLISSO, G.; TAGLIAMONTE, M.R.; RIZZO, M.R.; MANZELLA, D.; GAMBARDELLA, A.; VARRICCHIO, M. (1998). Oxidative stress and advancing age: results in healty centenarians. **Journal of the American Geriatrics Society**, 46, 833-838.

PARPART, A.K.; LORENZ, P.B.; PARPART, E.R. (1947). The osmotic resistence (fragility) of human red cells. **Journal of Clinical Investigation**, 26(4), 636-640.

PEREIRA, B. (1994). Exercício físico como pró-oxidante. **Revista Paulista de Educação Física**, 8, 77-89.

PERROTA, V.; SHINAIDER, A. (1992). Radicais livres de oxigênio: importância na fisiopatologia das lesões isquêmicas viscerais. **Anais da Academia Nacional de Medicina**, 152(1), 22-27.

PIRLICH, M.; LOCHS, H. (2001). Nutrition in the elderly. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, 15(6), 869-884.

PRISCO, D.; ROGASI, P.G.; PANICCIA, R.; ABBATE, R.; GENSINI, G.F. (1991). Age-related changes in red blood cell lipids. **Angiology**, 42, 316–322.

RABINI, R. A.; MORETTI, N.; STAFFONLANI, R.; SALVOLINI, E.; NANETTI, L.; FRANCESCHI, C.; MAZZANTI, L. (2002). Reduced susceptibility to peroxidation of erythrocyte plasma membranes from centenarians. **Experimental Gerontology**, 37, 657-663.

REITER, R.J. (1995). Oxidative Process and Antioxidative Defense Mechanisms in the Aging Brain. **The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, 9(7), 526-533.

RIFKIND, J.M.; ARAKI, K.; HADLEY, E.C. (1983). The relationship between the osmotic fragility of human erythrocytes and cell age. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 222(2), 582-589.

RIKANS, L.E.; HORNBROOK, K.R. (1997). Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. **Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease**, 1362(2), 116-127.

RITZ, B.W.; GARDNER, E.M. (2006). Malnutrition and energy restriction differentially affects viral immunity. **The Journal of Nutrition**, 136, 1141-1144.

ROTTENBERG, H. (1986). Solubility of ethanol in chronic alcoholism. The effect of ethanol feeding and its withdrawal on the protection by alcohol of rat red blood cells from hypotonic hemolysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, 855, 211-222.

ROVER, L.J.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L.T. (2001). Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos

eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, 24(1), 112-119.

RUBENSTEIN, L.Z.; HARKER, J.O.; SALVA, A.; GUIGOZ, Y.; VELLAS, B. (2001). Screening for undernutrition in geriatric practice: developing the short-form mini-nutritional assessment (MNA-SF). **The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, 56, M366-M372.

RUSSELL, N.J.; FUKUNAGA, N. (1990). A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, 75, 171-182.

SAAVA, M.; KISPER-HINT, I.R. (2002). Nutritional assessment of elderly people in nursing house and at home in Tallinn. **The Journal of Nutrition, Health & Aging**, 6, 93-95.

SAHYOUN, N.R.; JACQUES, P.F.; RUSSEL, R.M. (1996). Carotenoids, vitamin C and E and mortality in elderly population. **American Journal of Epidemiology**, 144(5), 501-511.

SALETTI, A.; LINDGREN, E.Y.; JOHANSSON, L.; CEDERHOLM, T. (2000). Nutritional status according to mini nutritional assessment in an institutionalized elderly population in Sweden. **Gerontology**, 46, 139-145.

SAMPAIO, L.R. (2004). Avaliação nutricional e envelhecimento. **Revista de Nutrição**, 17(4), 507-514.

SANT'ANA, L.S. (2004). Mecanismos bioquímicos envolvidos na digestão, absorção e matabolismo dos ácidos graxos ômega. **Revista Brasileira de Promoção da Saúde**, 17(4), 211-216.

SANTORO, M.M.; LIU, Y.; KHAN, S.M.; HOU, L.X.; BOLEN, D.W. (1992). Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. **Biochemistry**, 31(23), 5278–5283.

SASAKI, S. (1977). Red cell lipids in patients with end-stage renal failure: relationship to osmotic fragility. **Osaka City Medical Journal**, 23(1), 85-98.

SCHWAB, J.M.; SERHAN, C.N. (2006). Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, 6, 414-420.

SEN, C.K. (1998). Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. **Biochemical Pharmacology**, 55(11), 1747-1758.

SEN, C.K. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. **Med. Sci. Sports Exerc. 33**(3), 368-370, 2001.

SEVANIAN, A.; HOCHSTEIN, P. (1985). Mechanism and consequences of lipid peroxidation in biological systems. **Annual Review of Nutrition**, 5, 365-390.

SHAN X.O.; AW, T.Y.; JONES, D.P. (1990). Glutathione dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**, 47(1), 61-71.

SIES, H. (1985). **Oxidative stress**. London: Academic, 507 p.

SINGER, S.J.; NICHOLSON, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of the cell membranes. **Science**, 175, 720-731.

SIRICHOTIYAKUL, S.; TANTIPALAKON, C.; SANGUANSERMSRI, T.; WANAPIRAK, C.; TONGSONG, T. (2004). Erythrocyte osmotic fragility test for screening of alpha-thalassemia-1 and beta-thalassemia trait in pregnancy. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, 86, 347-350.

SJODIN, B.; WESTING, Y.H.; APLLE, F.S. (1990). Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, 10, 236-254.

SMITH, C.M.; MARKS, A.; LIEBERMAN, M. (2004). Oxigen toxicity and free radical injury. In: SMITH, C.M.; MARKS, A.; LIEBERMAN, M. (eds.) **Marks' Basic Medical Biochemistry**: a clinical approach. 2nd. ed. Baltimore, Lippincott, Williams & Wilkins, pp. 420-457.

SMITH, L.C.; MULLEN J.L. (1991). Nutritional assessment and indications for nutritional support. **The Surgical Clinics of North America**, 71(3), 449-457.

SOHAL, R.S.; SOHAL, B.H.; ORR, W.C. (1995). Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. **Free Radical Biology & Medicine**, 19, 499-504.

SOHAL, R.S.; WEINDRUCH, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, 273, 59-63.

SPRECHER, H.; LUTHRIA, D.L.; MOHAMMED, B.S.; BAYKOUSHEVA, S.P. (1995). Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. **Journal of Lipid Research**, 36, 2471-2477.

STALLINGS, V.A.; HARK, L. (1996). Nutrition assessment in medical practice. In: MORRISON, G., HARK, L. **Medical nutrition and disease.** Cambridge: Blackwell, p. 3-30.

STEGE, G.J.; WIERENGA, P.K.; KAMPINGA, H.H.; KONINGS, A.W. (1993). Hyperthermia, intracellular free calcium and calcium ion phores. **International Journal of Radiation Biology**, 64(4), 459-468.

STORRY, J.R. (2004). Review: The function of blood group specific RBC membrane components. **Immunohematology,** 20(4), 206-216.

SUESS, J.; LIMENTANI, D.; DAMESHESK, W. (1978). Quantitative method for the determination and charting of the erythrocytes hypotonic fragility. **Blood**. 3, 1290-1303.

TELEN, M.J.; KAUFMAN, R.E. (1999). The mature erythrocyte. In: Lee, G.R. *et al*. **Wintrobe´s Clinical Hematology**. Baltimore, Willians & Wilkins, 193-227.

THOMAS, D.R.; ZDROWSKI, C.D.; WILSON, M.M.; CONRIGHT, K.C.; LEWIS, C.; TARIQ, S.; MORLEY, J.E. (2002). Malnutrition in sub acute care. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 75, 308-313.

TIIDUS, P.M. Radical species in inflammation and their overtraining. (1998). **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 76(5), 533-538.

TUMA, D.J.; DONHUE, T.M.; MEDINA, V.A.; SORRELL, M.F. (1984). Enhancement of acetaldhyde-protein adduct formation by L-ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 234, 377-381.

TUMA, D.J.; NEWMAN, M.R.; DONOHUE, T.M.; SORREL, M.F. (1987). Covalent binding of acetaldehyde to proteins: participation of lysine residues. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, 11, 579-584.

URANO, S.; SATO, Y.; OTONARI, T.; MAKABE, S.; SUZUKI, S.; OGATA, M.; ENDO, T. (1998). Aging and oxidative stress in neurodegeneration. **Biofactors**, 7, 103-112.

VAN BLITTERSWIJK, W.J.; VAN DER MEER, B.W.; HILKMAN, H. (1987). Quantitative contributions of cholesterol and the individual classes of phospholipids and their degree of fatty acyl (un) saturation to membrane fluidity measured by fluorescence polarization. **Biochemistry**, 26(6), 1746-1756.

VAN DEN BIGGELAAR, A.H.; DE CRAEN, A.J.;; GUSSEKLOO, J.; HUIZINGA, T.W.; HEIJMANS, B. T.; FROLICH, M.; KIRKWOOD, T.B.; WESTENDORP, R.G. (2004). Inflammation underlying cardiac mortality is a late consequence of evolutionary programming. **The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, 18, 1022-1024.

VASDEV, S.C.; SUBRAHMANYAM, D.; CHAKRAVARTI, R.N.; WAHI, P.L. (1974). Effect of chronic ethanol-feeding on the major lipids or red blood cells, liver and heart of rhesus monkey. **Biochimica et Biophysica Acta**, 369, 323-330.

VELLAS, B.; GUIGOZ, Y.; GARRY, P.J.; NOURHASHEMI, F.; BENNAHUM, D.; LAUQUE, S.; ALBAREDE, J.L. (1999). The Mini Nutritionaltional Assessment (MNA) and its use in grading the nutritional state of elderly patients. **Nutrition**, 15, 116-122.

VERAS, R.P.; RAMOS, L.R.; KALACHE, A. (1987). Crescimento da população idosa no Brasil: Transformações e conseqüências na sociedade. **Revista de Saúde Pública**, 21(3), 225-233.

VERAS, R.P.; COUTINHO, E.; NEY, G. JR. (1990). População idosa no Rio de Janeiro (Brasil): estudo-piloto da confiabilidade e validação do segmento de saúde mental do questionário BOAS. **Revista de Saúde Pública**, 24(2), 156-163.

VETTA, F.; RONZONI. S.; TAGLIERI, G.; BOLLEA, M.R. (1999). The impact of malnutrition on the quality of life in the elderly. **Clinical Nutrition**, 18, 259-267.

VIGH, L.; MARESCA, B.; HARWOOD, J. (1998). Does the membrane´s physical state control the expression of heat shock and other genes? **Trends in Biochemical Sciences**, 23, 369-374.

WAITZBERG, D.L.; FERRINI, M.T. (2000). Exame físico e antropometria. In: WAITZBERG, D.L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, p. 255-294.

WANDER, R. C.; HALL, J.A.; GRADIN, J.L.; DU, S.H.; JEWELL, D.E. (1997). The ratio of dietary (n-6) to (n-3) fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs. **The Journal of Nutrition**, 127, 1198-1205.

WEBER, F.J.; BONT, J.A. (1996). Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1286, 225-245.

WEED, R.I.; REED. C.F. (1966). Membrane alterations leading to red cell destruction. **The American Journal of Medicine**, 41, 681-694.

WEISMANN, A. (1891). The continuity of the germ plasm as the foundation of a theory of heredity. In: POULTON, S.; SCHONLAND, S.; SHIPLEY, A.E. (eds.) **Essays upon Heredity and Kinded Biological Problems**, 2nd. ed., vol. 1. Oxford, Clarendon Press [Reprint: New York, Baker Science], pp. 163-256.

WILLIAMS, G.C. (1957). Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. **Evolution**, 11, 398-411.

WILLIAMS, W.J. (1995). Haematology in the aged. In: BEUTLER, E., LICHTMAN, M.A., COLLER, B.S., KIPPS, T.J. (eds), **Williams Haematology**, 5th. ed. New York, McGraw-Hill Inc., pp. 72-77.

WISEMAN, H. (1996). Dietary influences on membrane function: importance in protection against oxidative damage and disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 7, 2-15.

YATVIN, M.B.; GIPP, J.J.; RUSY, B.F.; DENNIS, W.H. (1982). Correlation of bacterial hyperthermic survival with anaesthetic potency. **International Journal of Radiation Biology**, 42, 141-149.

YINGST, D.R.; POLASEK, P.M.; KILGORE, P. (1985). The effect of ethanol on the passive Ca permeability of human red cell ghosts measured by means of arsenazo III. **Biochimica et Biophysica Acta**, 813, 277-281.

YU, B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, 74(1), 139-162.

ZAUBER, N.P.; ZAUBER, A.G. (1987). Haematologic data of healthy very old people. **The Journal of the American Medical Association**, 257, 2181- 2184.

ZOPPI. C.C. (2005). Mecanismos moleculares sinalizadores da adaptação ao treinamento físico. **Revista Saúde. Com**, 1(1), 60-70.

ANEXO

Mini Avaliação Nutricional MAN
Mini Nutritional Assessment MNA™

Nestlé

Sobrenome: Nome: Sexo: Data:

Idade: Peso (kg): Altura (cm): Leito:

Preencher a primeira parte deste questionário, indicando a resposta. Somar os pontos da Triagem. Caso o escore seja igual ou inferior a 11, concluir o questionário para obter o escore de indicação de desnutrição.

Triagem

A Nos últimos três meses houve diminuição da ingestão alimentar devido a perda de apetite, problemas digestivos ou dificuldade para mastigar ou deglutir?
0 = diminuição severa da ingestão
1 = diminuição moderada da ingestão
2 = sem diminuição da ingestão ☐

B Perda de peso nos últimos meses
0 = superior a três quilos
1 = não sabe informar
2 = entre um e três quilos
3 = sem perda de peso ☐

C Mobilidade
0 = restrito ao leito ou à cadeira de rodas
1 = deambula mas não é capaz de sair de casa
2 = normal ☐

D Passou por algum estresse psicológico ou doença aguda nos últimos três meses?
0 = sim 2 = não ☐

E Problemas neuropsicológicos
0 = demência ou depressão graves
1 = demência leve
2 = sem problemas psicológicos ☐

F Índice de massa corpórea (IMC = peso [kg] / estatura [m]²)
0 = IMC < 19
1 = 19 ≤ IMC < 21
2 = 21 ≤ IMC < 23
3 = IMC ≥ 23 ☐

Escore de triagem (subtotal, máximo de 14 pontos) ☐☐

12 pontos ou mais — normal; desnecessário continuar a avaliação

11 pontos ou menos — possibilidade de desnutrição; continuar a avaliação

Avaliação global

G O paciente vive em sua própria casa (não em casa geriátrica ou hospital)
0 = não 1 = sim ☐

H Utiliza mais de três medicamentos diferentes por dia?
0 = sim 1 = não ☐

I Lesões de pele ou escaras?
0 = sim 1 = não ☐

J Quantas refeições faz por dia?
0 = uma refeição
1 = duas refeições
2 = três refeições ☐

K O paciente consome:
- pelo menos uma porção diária de leite ou derivados (queijo, iogurte)? sim ☐ não ☐
- duas ou mais porções semanais de legumes ou ovos? sim ☐ não ☐
- carne, peixe ou aves todos os dias? sim ☐ não ☐

0,0 = nenhuma ou uma resposta «sim»
0,5 = duas respostas «sim»
1,0 = três respostas «sim» ☐,☐

L O paciente consome duas ou mais porções diárias de frutas ou vegetais?
0 = não 1 = sim ☐

M Quantos copos de líquidos (água, suco, café, chá, leite) o paciente consome por dia?
0,0 = menos de três copos
0,5 = três a cinco copos
1,0 = mais de cinco copos ☐,☐

N Modo de se alimentar
0 = não é capaz de se alimentar sozinho
1 = alimenta-se sozinho, porém com dificuldade
2 = alimenta-se sozinho sem dificuldade ☐

O O paciente acredita ter algum problema nutricional?
0 = acredita estar desnutrido
1 = não sabe dizer
2 = acredita não ter problema nutricional ☐

P Em comparação a outras pessoas da mesma idade, como o paciente considera a sua própria saúde?
0,0 = não muito boa
0,5 = não sabe informar
1,0 = boa
2,0 = melhor ☐,☐

Q Circunferência do braço (CB) em cm
0,0 = CB < 21
0,5 = 21 ≤ CB ≤ 22
1,0 = CB > 22 ☐,☐

R Circunferência da panturrilha (CP) em cm
0 = CP < 31 1 = CP ≥ 31 ☐

Avaliação global (máximo 16 pontos) ☐☐,☐
Escore da triagem ☐☐
Escore total (máximo 30 pontos) ☐☐,☐

Escore de Indicação de Desnutrição

de 17 a 23,5 pontos — risco de desnutrição ☐
menos de 17 pontos — desnutrido ☐

Ref.: Guigoz Y, Vellas B and Garry PJ. 1994. Mini Nutritional Assessment: A practical assessment tool for grading the nutritional state of elderly patients. *Facts and Research in Gerontology*. Supplement # 2:15-59.
Rubenstein LZ, Harker J, Guigoz Y and Vellas B. Comprehensive Geriatric Assessment (CGA) and the MNA: An Overview of CGA, Nutritional Assessment, and Development of a Shortened Version of the MNA. In: "Mini Nutritional Assessment (MNA): Research and Practice in the Elderly". Vellas B, Garry PJ and Guigoz Y, editors. Nestlé Nutrition Workshop Series. Clinical & Performance Programme, vol. 1. Karger, Bâle, in press.

©1998 Société des Produits Nestlé S.A., Vevey, Switzerland, Trademark Owners